

極低照射量電子線回折法および放射光 X 線回折法による  
ヒト皮膚角層微細構造と水分透過性の関係解析

関西学院大学理工学部

中沢 寛光

## 要旨

人体を覆う“皮膚”の最も重要な役割は、外界からの異物の侵入を防ぐ“バリア機能”を発揮することであり、それには皮膚の最外層に位置する“角層”が重要な役割を担う。角層は主にケラチンを主成分とする板状の“角質細胞”と、その周りを取り囲む“細胞間脂質”から構成され、この構造体が高密度化(高秩序化)された状態で存在することで、高いバリア性能が発揮される。一方、この高秩序化構造は、経皮吸収性の薬剤などの体内への浸透に対しては大きな障壁となる。よって、経皮吸収性に優れた薬剤の開発には、薬剤と角層の相互作用を分子レベルで明らかにすることが重要となるが、個体差等の問題により、現在のところ角層の構造特性や物性、特に角層と物質との相互作用に関する知見はほとんど得られていない。本研究では、既成の電子線回折法および X 線回折法に改良を加え、角層構造の個体差の問題などを克服した新しい角層構造解析手法を開発し、それらを用いて生体及び薬剤の基本物質である“水”の角層に対する役割や、角層内での挙動を明らかにすべく、様々な実験を実施した。

非侵襲的な実験が実施できる電子線回折法では、検出器等を工夫することで、従来よりも大幅に角層に対するビームダメージを低減化できることがわかった。これにより常温での実験が可能となり、より汎用的に統計学的な実験を展開することが可能となった。当手法を用いて角層構造の部位差解析や経皮水分蒸散量(TEWL)と細胞間脂質構造の相関解析実験を実施したところ、額や頬に比べて、腕では細胞間脂質の **Orthorhombic (Ort)** 構造が有意に多くなっていることがわかった。さらに額や頬と比べて、腕では **TEWL** が有意に低くなっており、個体差を含めた相関解析においては、“**Ort** 構造と **TEWL** の相関性”が示唆された。

角層に対するビームダメージが比較的小さく、同一試料で連続測定が可能な X 線回折実験では、シート状角層の表裏の環境を独自に制御することが出来る“外部環境 2 分型薄膜構造解析用試料セル(外部環境 2 分セル)”を開発し、これを用いて“**TEWL** と角層構造の同時温度変化解析”を実施した。その結果、細胞間脂質の **Ort** 構造の相転移温度付近より **TEWL** が上昇し、その変化は細胞間脂質の **Hexagonal (Hex)** 構造が相転移を終える温度付近で収束することがわかり、細胞間脂質のドメイン構造が **TEWL** に影響を与えている可能性が示唆された。本検討において確立した新しい角層の構造解析手法により、角層内の水の挙動に対する細胞間脂質の役割が初めて明らかとなった。

## 1. 緒言

### 1.1 皮膚とは

生体が生命活動を維持するためには、生体と外界を隔離する境界となる組織が必要不可欠である。当然ながらこの境界には、外部からの力学的な作用や紫外線などの有害な電磁波、乾燥や過度の湿潤、激しい温度変化など、自然界にごくありふれた様々な刺激から生命体を適切に保護し、内部の物質が外部へ流出しないようにする機能が要求される。このような保護機能を確実に実行するためには、甲殻類や貝類などのように、生体自体を強固な鎧で覆うのが一つの方法であるが、それでは体は保護されるが生体の運動性や柔軟性は低くなり、生命活動の範囲が大幅に抑制されてしまう。この境界としての組織には、様々な外部刺激から生体を的確に守る強固な保護性能と、生体の行動性を極力抑制しない適度な柔軟性の両方の特性が備わっていることが望ましい。この相反する二つの機能を併せ持つ境界組織の一つが、我々哺乳類が進化の過程で勝ち取った“皮膚”である。皮膚は軟組織でありながら、上述したような様々な外部刺激から生体を確実に保護し、生体内物質、とりわけ我々の体の 60～70 %を占める水が、体の外へ過剰に流出するのを適度に防ぐことができる[1]。一般に、このような皮膚の防御機能を、“皮膚バリア機能”と呼ぶ[2]。このバリア機能を発揮し、生体を的確に保護することが、皮膚の最大の役割となる。しかし、皮膚の役割はこれだけに留まらず、感覚器官や、体温調節の場としての役割があり、さらに皮膚には刺激に対して自ら応答するような能力も備わっており[3]、その機能性や総重量から、人体最大の臓器であると定義されている。

### 1.2 皮膚の基本構造について

皮膚は大きく分けて、体外側の厚さ 0.1 mm 程度の表皮と、体内側で厚さが 1 mm 程度で表皮の土台となる真皮から構成されている(図 1)。真皮の主成分は、繊維芽細胞や繊維芽細胞が産生するコラーゲン、エラスチンといった繊維状タンパク質であり、主に力学的刺激から生体を保護する皮膚の弾力性を司る。一方で、表皮の主成分はケラチノサイトと呼ばれる細胞であり、真皮と結合したケラチノサイトだけが細胞分裂を絶えず繰り返し、分裂した細胞を順に上へと押し上げて表皮全層を形成している。押し上げられた細胞は上に行くにつれて、次第に形状を扁平状に変化させ、最終的には脱核して角化し、細胞自体が死を迎える。後の項で詳しく述べるが、このケラチノサイトが脱核し最終形態になった領域は「角層」と呼ばれ、皮膚バリア機能に対して特に重要な役割を発揮する[1]。角層最表層の角質細胞は、最終的には垢として剥離落屑する。下層からの供給と剥離のバランスにより、この角層を構成する細胞の層数は、常にほぼ一定値に保たれる。また、この一連の細胞の形態変化(細胞分裂から剥離まで)は表皮のターンオーバーと呼ばれ、その周期はおおよそ 4～6 週間であると言われている。またこのケラチノサイトの形態上の特徴から、表皮は下層から基底層、有棘層、顆粒層、角層と分類されることもある。また基底層にはケラチノサイトだけでなく、紫外線に対する防御物質であるメラニンを産出するメラノサイトや、様々な刺激を感受するランゲルハンス細胞、メルケル細胞なども存在しており、それらが反応場としての役割を担っている[4][5]。

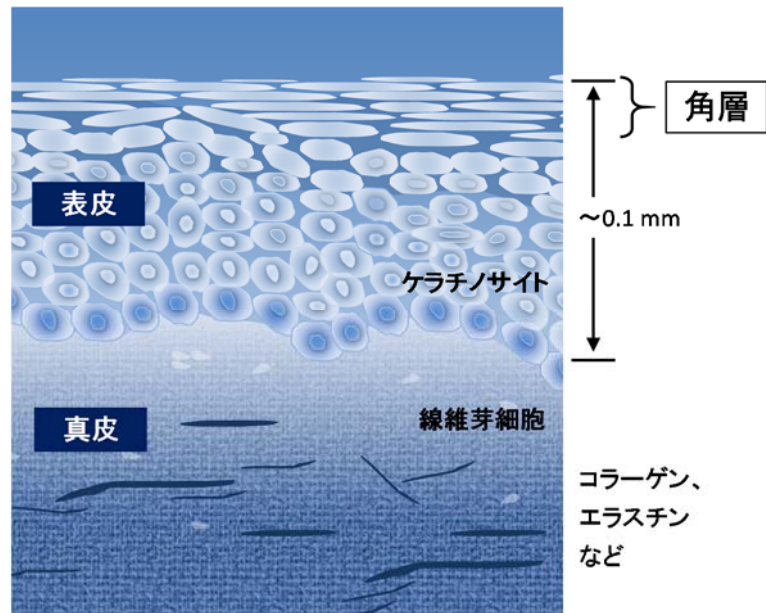


図 1 皮膚の基本構造

皮膚は真皮とその上に位置する表皮から構成される。真皮にはコラーゲンやエラスチンといった繊維状タンパク質が、表皮にはケラチノサイトが存在する。真皮直上のケラチノサイトが絶えず細胞分裂を繰り返し、上へと順に押し上げられた細胞が次第に細胞の形を扁平状に変え、最後に脱核し角層を形成する。表皮の厚さは部位によっても大きく異なるが、おおよそ 100  $\mu\text{m}$  程度である。

### 1.3 角層について

ターンオーバーの最終過程において、ケラチノサイトは当初の球状から扁平状の細胞形態にまで変化する。この段階において、もはや細胞内に核は存在せず、細胞は完全に死んだ状態となっている。細胞内部は繊維状のタンパク質であるケラチン分子で満たされ、また細胞膜はインボルクリンやロリクリン、フィラグリンという不溶性のタンパク質で構成され、通常の細胞と比較して物理化学的に強固な構造を形成する。それまで存在していたアクアポリンなどの膜タンパク質は [6][7]、ほぼアミノ酸にまで分解され、細胞内部のケラチン繊維の隙間等に存在していると考えられている。このアミノ酸などの低分子量の物質は天然保湿因子 (natural moisturizing factor; NMF) と呼ばれ、角層の保水機能に重要な役割を果たしている [8][9]。このような脱核し、扁平状になったケラチノサイトを、特に角質細胞と呼ぶ。体の部位によっても異なるが (腕や首で薄く、手のひらや足の裏では厚い)、正常な皮膚の最上層では角質細胞が 10~20 層程度堆積しており、またそれ以上は堆積することなく、最終的には最表面の角質細胞から順に、垢として剥離していく。

このケラチノサイトが顆粒層から角層へと移行する段階において、細胞内から層板顆粒 (ラメラボディー) と呼ばれるリン脂質やスフィンゴミエリン、糖セラミド、コレステロールおよびその類縁体などの脂質分子を多量に含む袋状構造物が放出される [10] (ラメラボディーの形状については興味深い様々な議論がある [11])。それらの脂質分子が分解酵素の作用を受け、セラミド、コレステロール、遊離脂肪酸等に分解された後 (図 2) [12]、角層内で角質細胞の細胞間の隙間に充填配列される。この角層内の脂質を細胞間脂質と呼ぶ。正常なヒトの角層においては、セラミ

ド、脂肪酸、コレステロールがおおよそ 1:1:1 のモル比で存在していると言われている[13]。物理化学的に強固な角質細胞と、その周りを充填する細胞間脂質の関係は、よくレンガとモルタルの関係に例えられ[1]、この特異な構造故、バリア機能に対して重要な役割を果たしていると考えられている。角層がなければ生体は水分子を体内に維持することができず、体は干乾びやがて死んでしまう。角層は、それを構成する細胞はすでに死んでいるが、生命が生きるためには必須の組織であると言える。

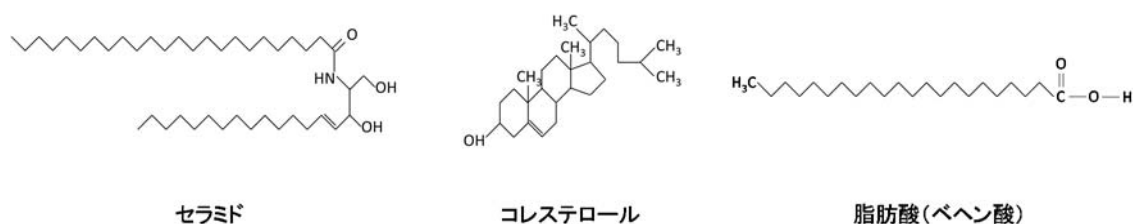


図 2 セラミド、コレステロール、脂肪酸の分子構造

セラミド、コレステロール、脂肪酸の代表的な分子構造を示した。現在までにセラミドはスフィンゴシン骨格の異なる 10 数種類の分子種の存在が確認されている（図で示したのはセラミドⅡ（NP）である。）。コレステロールも 1 種類ではなく、コレステロールエステルやコレステロール硫酸などの類縁体が、また脂肪酸も様々な鎖長や、飽和鎖、不飽和鎖を持つものが存在することが確認されている。

#### 1.4 細胞間脂質の配列構造およびその分析法

顆粒層において細胞外に分泌された脂質分子は、様々な分解酵素の影響を受けた後、その一部は角質細胞の不溶性の膜タンパク質と化学的に結合する。このような結合は、セラミド分子種の中に、その分子骨格の $\omega$ 位に水酸基を有するものが含まれており（ $\omega$ -hydroxy ceramide）、この水酸基と膜タンパク質のカルボキシル基がエステル化反応を起こすことで形成される[14]。この膜タンパク質に結合した $\omega$ -hydroxy ceramide がアンカーとなり、また脂質分子自身の疎水相互作用により、その他の脂質分子が $\omega$ -hydroxy ceramide の間や上部に規則正しく整列して、結果的に脂質ラメラ構造を形成すると考えられている。ヒトやマウス、ラットなどの角層を酸化オスミウムや酸化ルテニウムで染色し、超薄切片を作製して透過型電子顕微鏡で観察すると、角質細胞の隙間にきれいな層状の縞模様を観察することができる（図 3）[15][16][17]。これは、酸化オスミウムや酸化ルテニウムが、細胞間脂質の親水基や不飽和部と特異的に化学結合した結果、重原子の分布にコントラストが形成されたことに由来する。また、その層状構造は、ある個所では 13 nm 程度の周期性を持ったトリラメラ構造（バイレイヤー +  $\alpha$ ）を形成しているように観察され、また別の箇所では 6 nm 程度の周期性を持ったラメラ構造（バイレイヤー）が形成されているように観察される[18][19]。これらの観察結果は、後に示す X 線や中性子線による回折の結果の結果とよく一致している。

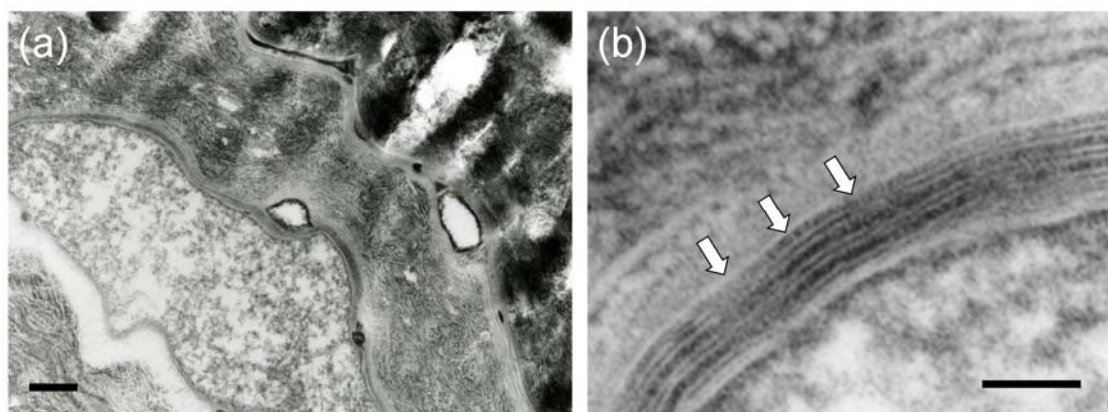


図 3 角層の超薄切片写真

酸化オスミウム、酸化ルテニウムで染色されたヒト皮膚角層の超薄切片の電子顕微鏡写真 (a) とその拡大図 (b)。角質細胞と角質細胞の間のわずかな隙間に、数層のコントラストのある縞模様が観察され、細胞間脂質（白抜き矢印）がラメラ構造を形成していることが確認できる。bar : (a) 0.2  $\mu\text{m}$ , (b) 20 nm

近年、マウスの角層に X 線(放射光)を照射すると、小角領域に細胞間脂質ラメラ構造由来の反射が観察されることが White らによって見出された[20]。White らはこの論文の中で、そのブラッグ反射の位置は 13.1 nm に対応しており、それまでに電子顕微鏡切片観察法にて確認されていた周期構造とおおよそ一致することを報告している。さらに彼らはこの論文において、この細胞間脂質を有機溶媒で抽出して水溶液中に分散してもラメラ構造が形成されないことから、ラメラ構造の形成には基盤となる角質細胞と、その周囲に存在するタンパク質の存在が重要だと結論付けている。

この角層の X 線小角散乱実験を大幅に進展させたのが、オランダライデン大学の Bouwstra らのグループである。Bouwstra らは White らの実験を参考にして角層の X 線回折実験をさらに展開し、マウスだけでなくラットやヒトの角層でも同様の実験を実施、ラメラ構造には種差があること、またラメラ構造は 13 nm の長周期構造をもつもの (LPP) だけでなく、6 nm 程度の短周期構造を持つもの (SPP) も存在することを明らかにしている[21]。この 2 種類のラメラ構造に関する詳細については、それらの存在様態や形成機構などまだまだ不明なところが多いが、その後の研究により、マウスでは LPP が多く存在しているがヒトでは SPP が多く存在していること、また角層を  $-20^{\circ}\text{C}$  と  $120^{\circ}\text{C}$  の間で昇降温処理を繰り返すことにより、LPP の存在比率を大きくすることができること等が、Bouwstra らの研究により明らかになっている[21][22]。

その後、Bouwstra らのグループに追従する形で多くの研究者が当研究に参加し、当分野の発展に大きく貢献してきている。*in vivo* や *ex vivo* の研究だけでなく、角層より細胞間脂質を抽出して再構成脂質膜を作製することで、さまざまな脂質分子のラメラ構造に対する基本特性を明らかにするような *in vitro* の研究も多く展開されている[23][24][25][26]。これらの研究により、LPP の形成にはセラミド 1 と呼ばれる  $\omega$ -hydroxy ceramide の  $\omega$  位に脂肪酸が結合したセラミド分子の存在が不可欠であることが明らかとなっている[27][28]。また、SPP の関連研究としては以下のような興味深い研究結果も報告されている。細胞間脂質は他の生体脂質と比較して疎水的性質の強い脂質分子であり、よって細胞間脂質ラメラ間には水分子は存在しないと長く考えられてきた。しかし Ohta らは、マウス角層の含有水分量を多くしていくと、SPP の繰り返しラメラ周期が徐々に長くなっていくことを確認しており、SPP のラメラ間に水が存在していることを明らか



にしている[29]。この結果は、その後の Charalambopoulou らの中性子線回折の実験結果とも一致しており[30]、細胞間脂質のラメラ構造の研究に大きなインパクトを与えた。他種に比べて、ヒトの角層中には SPP が特に多く存在していることが報告されているが、ヒト角層の含有水分量がヒトの角層の構造やその機能に与える影響についてはよく知られておらず、その詳細を調査することは重要な課題であると思われる。

このような特徴を持つラメラ構造であるが、細胞間脂質の炭化水素鎖はその内部において側方に規則正しく配列(パッキング)され、ちょうど結晶と液晶の中間状態のようないくつかの相を形成する[31][32][33]。正常なヒトの角層内においては、より結晶状態に近いものから順に斜方晶(Orthorhombic; Ort)、六方晶(Hexagonal; Hex)、流動相(Liquid; Liq)の 3 つの相の存在が確認されており、また最近では擬斜方晶(pseud-Orthorhombic; Ort\*)のような中間的な構造の存在についても指摘されている[34][35]。図 4 ではこれら細胞間脂質の配列構造の模式図を示している。

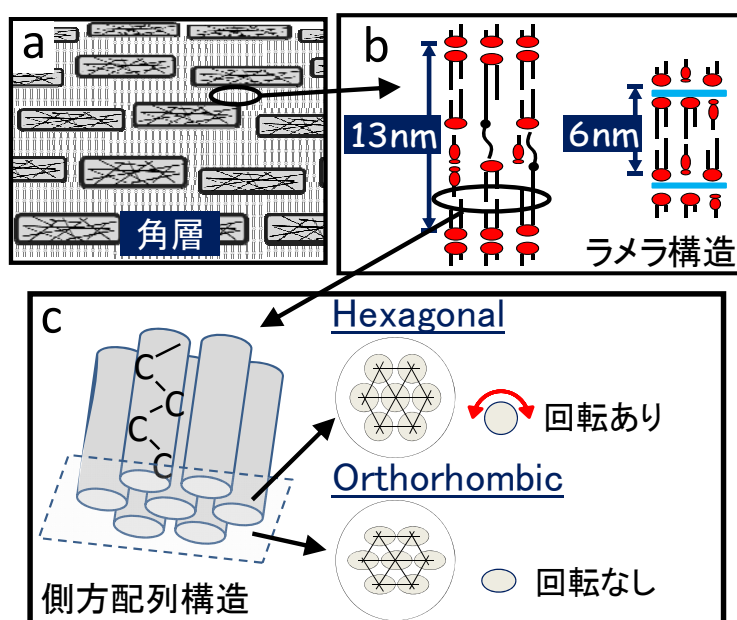


図 4 細胞間脂質のラメラ構造の模式図

(a) 角質細胞の間には細胞間脂質の液晶様のラメラ構造が存在する。この構造はちょうどレンガ(角質細胞)をモルタル(細胞間脂質)で補強する構造に例えられる。(b) またそのラメラ構造には 13 nm と 6 nm の周期性が伴っており、(c) さらに細胞間脂質の炭化水素鎖は、ラメラ構造内において規則正しく側方に配列され、Ort や Hex などの側方配列構造を形成する。またより流動的な領域の存在も確認されており、これらの相が共存していると考えられている。

細胞間脂質の炭化水素鎖の側方配列構造については、その後の X 線広角散乱実験により詳細に調べられている。Bouwstra らはヒト角層の構造の温度変化解析を実施し、Ort 構造が 40℃付近で、Hex 構造が 80℃付近で消失することを明らかにし[31]、また八田らはマウスの角



層で同様に温度変化解析を実施し、ヒトの角層と同様の温度構造変化を確認し、さらに LPP の主要な構成要素は Hex 構造であり、逆に SPP の主要な構成要素は Ort 構造であると報告している[36]。

この細胞間脂質の配列構造を解析する手法としては、上述の X 線回折法や中性子線回折法の他に電子線回折法によるものがある[32][34][37][38][39]。電子線回折実験は、通常の 100kV 程度の透過型電子顕微鏡 (TEM) があれば実施することができ、大型の放射光施設や原子炉を必要とせず、汎用性が高く非常に簡便である。また X 線や中性子線に比べ、電子線の試料との相互作用は格段に大きいので、短時間かつ少量の試料で回折像を取得することができ、非侵襲的な実験展開が可能となる (X 線や中性子線回折実験では、多量の角層が必要となり、実験には皮膚の摘出手術やヘアレスマウスなどの代替動物の使用が避けられない。)。従って、電子線回折では、多くのデータを取得し、統計学的に実験データを解析するような実験展開の可能性があり、個体差や部位差など多くのバラつきを持つ生体試料の解析には強力なツールとなりうる[40][41]。一方で、試料との相互作用が大きいということは、同時に透過力が小さく、試料に対する電子線のダメージが大きいということを意味し、さらに生体組織のような不導体試料ではチャージアップによるドリフト現象なども問題となり、いくつかの実験手技上の工夫が必要となる。特に、透過力の問題では、極薄の角質細胞 1 個を中空の状態 (電子線の透過パスに角質細胞 1 個しか存在しない) で保持する必要がある、試料の調製方法にも工夫を要する。また電子線回折実験では、試料を超高真空中に置く必要があり、実験環境が制限されることも一つのデメリットに挙げられる。X 線、中性子線と電子線それぞれの実験上の特性を考慮して、それぞれを適切に併用することが重要となる (表 1)。

表 1 X 線回折法と電子線回折法それぞれの角層の構造解析法の特徴

	電子線回折	X線(放射光)回折
散乱	<u>強い</u>	弱い
試料の採取	<u>非侵襲</u>	外科的手術必要
試料ダメージ	大きい	<u>小さい</u>
分解能	低い	<u>高い</u>
実験条件	高真空	<u>常温・常圧可</u>
情報	<u>局所構造</u> 側方パッキング構造のみ	平均構造 <u>ラメラとパッキングの両方</u>
装置	<u>一般的なTEMがあれば良い</u>	大規模放射光施設

X 線 (放射光) は高精度かつ様々な環境下での実験が可能である点が、また電子線は非侵襲的および統計学的な実験展開が可能である点がそれぞれの特長である。

ヒト角層の構造を電子線回折法で解析する際には、上記のような点が問題となるが、この電子線回折法の手技上の問題点をうまく解決し、角層の電子線回折法を実用化させたのが **Bouwstra** らと同じライデン大学の研究グループの **Pilgram** らである。彼らは電顕観察用のグリッドに、グリッド孔を閉塞することなく接着剤を塗布し、ヒトの皮膚表面から角質細胞をうまく回収して、角質細胞 1 個 1 個を中空の状態で固定して電子顕微鏡内に設置する方法を開発した [32]。この方法はグリッドストリッピング法と呼ばれる [32]。角質細胞は扁平な六角形の板状の構造をしており、その直径はおおよそ 30  $\mu\text{m}$  程度である。従ってこれを回収し固定するためのグリッドの間隔もまた、同じオーダーのサイズである必要があるが、このような小径のグリッドにその隙間を閉塞することなく接着剤を塗布することは実際かなり難しい。**Pilgram** らはグリッドストリッピング法を用いて、健康人及び皮膚病患者の皮膚から角質細胞を多く回収して電子線回折像を取得し、その両者の構造を統計的に比較して、細胞間脂質の配列構造上の違いを明らかにすることに成功している [37]。また、角層の上層と下層では細胞間脂質の配列構造が異なっていることも明らかにしており、上層では **Ort** 構造の存在比率が有意に低下していて、それには皮脂などの流動性のある脂質分子の陥入が原因ではないかと考察している [32]。このような局所的かつ統計的な実験は X 線回折法で展開することは難しく、よって、散乱能が高く非侵襲的な実験ができるという電子線の特徴をうまく利用した研究成果であると言える。

X 線に比べて、電子線の角層試料に対するビームダメージは格段に大きいので、実験ではビームダメージによる試料の構造崩壊に細心の注意を払う必要がある。これに対し **Pilgram** らは、試料を液体窒素で冷却することで、角質細胞に対する電子線のビームダメージを低減化する手法を採用している。しかしながら、試料を冷却することでビームダメージは低減化されるが、細胞間脂質などの脂質分子は温度相転移することが知られており、冷却による相状態の変化が懸念されるところである。しかも、彼らの試料は -170°C 近くにまで冷却されており、このような極低温下では相状態の変化だけでなく、試料交換時の氷晶の発生やそれによる回折像の精度低下は避けられない。このような手法は、電子線の特徴でもある汎用的で広範囲の実験の実施の可能性を大幅に低下させることにもつながり、致命的である。電子線による角層の構造解析法は大変有用であるが、これらの点に関してはまだまだ改善の余地が残る。

### 1.5 角層のバリア機能と経皮吸収

前項で述べたように、皮膚の最も重要な役割は、生体の恒常性を維持するために皮膚バリア機能を発揮することにある。この皮膚バリア機能に対して主要な役割を果たしているのが、皮膚の最表層に位置する角層である [1][2]。近年、角層直下の顆粒層に存在するタイトジャンクションと呼ばれる細胞間の結合を担うタンパク質が、バリア機能に影響していることも報告されている [42]、角層がなければ水分子を生体内にと留めることはもはや不可能であり、バリア機能を担う主要組織は角層であると言っても過言ではない。生体が過酷な乾燥環境に晒されても、厚さにしてわずか 10 数  $\mu\text{m}$  程度の角層が、生命活動を維持する上で必要な量の水分子を生体内に留める能力を保有することは驚くべきことであり、界面化学的にも大変興味深い。この水分の遮蔽能力は、同程度の厚さのプラスチック製の膜に相当するとも言われている。近年、アトピー性皮膚炎などの疾患皮膚では、バリア機能が低下していることが報告されており [43]、またそれらの皮疹部において、ある特定の種類のセラミド分子の量が極端に少なくなっていることや [44]、**Ort** 構造が有意に少なくなっていることなどが明らかとなっている [37]。また、様々な脂質分子を用いて作製した *in vitro* 人工ラメラ膜の実験においては、**Ort** 構造の存在量と物質の膜間透過性の間に負の相関が認められており [45]、徐々に細胞間脂質の構造とバリア機能の関係性が明らかにされつつある [46]。

一方で、この角層の高秩序化された細胞間脂質の配列構造は、経皮吸収性の薬剤の開発という観点から見ると、厄介な障壁以外の何物でもない [47]。経皮吸収による投薬は、経口投与や

注射によるものなど他の投薬方法と比べて、代謝による薬剤の性能低下や患者負担の低減化を図ることができ、有用な投薬方法であると言える[48]。今後ますますその市場拡大が期待される場所であるが、最大の問題は角層のバリア機能が優れており、薬剤そのものが皮膚内に浸透しにくいということである。主な経皮吸収のルートとしては、角質細胞や細胞間脂質の領域を透過するものと、汗腺や皮脂腺などの付属器官を透過するものに大別されるが、それらの専有面積の関係から、一般的な薬剤などの低分子量(1000 程度以下)の物質に関しては、前者を経て浸透していくものが主流であると考えられている[49][50]。また、角質細胞と細胞間脂質の極性の違いから、親水的なものは主に角質細胞ルートを経て、疎水的なものは主に細胞間脂質ルートを経て体内に浸透していくと考えられている(図 5)。しかしながら、角質細胞を通るルートは連続層ではなく、また一部の低分子量の物質を除き、そもそも親水的な物質は角層に馴染み難いという性質があり、よって、薬剤の効率的な経皮吸収を考える場合、細胞間脂質の大きな障壁をどのようにして越えるかということが重要な課題となる[47]。そのためにはまず、細胞間脂質そのものの物性や膜特性を把握したうえで、様々な物質と細胞間脂質との相互作用について詳しく知る必要がある[51]。

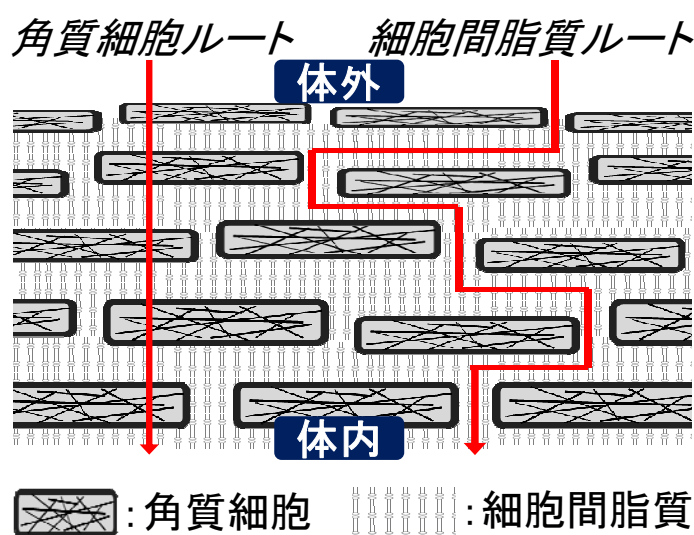


図 5 角層を介する薬物吸収のルート

角層を介する薬物吸収のルートとしては、主に親水的な角質細胞内部を透過するルートと、疎水的な細胞間脂質領域を透過するルートがあると考えられている。

このバリア機能を定量的に評価する手法としては、生体の皮膚に薬物を塗布し、一定時間後の血中内の薬物濃度を測定する方法や、切り出してきた皮膚をフランツセルと呼ばれる円筒状容器とカップ状容器で構成される 2 つの容器の間に挟み込み、上部の円筒容器に入れた薬剤の一定時間後の下部カップ内の濃度を測定する手法などがある[16]。しかし、このどちらの手法に関しても医学的な手技や代替動物での実験が必要とされるため、実験実施上の制約は大きい。そこで、皮膚表面から単位面積当たり、単位時間当たりに蒸発する水分の量、すなわち経皮水分蒸散量(tansepidermal water loss; TEWL)を測定することで、皮膚のバリア機能を定量

的に評価する方法が広く用いられている[52][53]。この TEWL の値は、円筒状の測定プローブ内に配置された、温湿度センサーの測定値の時間変分によって測定される。当然ながら発汗量や外気の湿度などによる影響を受けやすいが、発汗がコントロールされかつおおよそ外部湿度 30～50%の一定環境下での測定においては、上述の皮膚物質透過量とよく相関していることが確認されており[53]、皮膚バリア機能を容易に定量化できる数少ない手法として広く重用されている。

## 1.6 本研究の目的

近年、電子線回折法によるヒト皮膚角層構造の解析手法が確立され、さらに放射光技術が飛躍的に発展したことにより、非晶性の生体試料においても分子レベルの構造解析が可能となり、その結果、皮膚角層の細胞間脂質の構造が徐々に明らかにされつつある。今後、これらの構造情報の下に、皮膚バリアメカニズムを解明し、より浸透性の高い経皮吸収薬等の開発研究を展開していくためには、細胞間脂質の構造特性をさらに詳細に解析し、角層と物質の相互作用、つまり角層の構造と機能の関係性を明らかにしていくことが重要な課題になる。しかしながら、種々の物質が角層の構造に与える影響は小さく、よってこれらの解析には高精度なデータが必要となるが、ヒト角層の構造には生体試料特有の個体差や部位差、局所差が少なからず存在しており、そのことがこれらの解析を複雑化し、当関連研究の発展の大きな妨げとなっている。そこで我々は、角層構造の個体差の問題などを解決すべく、既成の電子線回折法および X 線回折法によるヒト皮膚角層の構造解析法に様々な改良を加え、それらを用いて構造解析実験を実施し、種々の物質と角層の相互作用を明らかにすることを最終目的として研究を展開している。本研究では、特に、生体及び薬剤の基本物質である“水”に着目し、水分子が角層の構造に与える影響や、水分子の角層内での挙動を明らかにすべく、様々な実験を実施した。

電子線回折実験においては、検出器や光学系に工夫を加えることで、試料に対する電子線の照射量を可能な限り低減化し、常温下で簡便に角質細胞の構造解析できる手法を確立した。この手法を利用して、従来よりも格段に多くの試料を採取して構造解析を実施し、試料採取時の TEWL 測定値との相関解析を実施することで、角層の構造と水に対するバリア機能の関係性について評価した。

X 線回折実験においては、含有水分量の異なる角層の構造を詳細に解析することで、角層内部に存在する水分子が角層の構造そのものに与える影響を解析した。さらに角層の構造と角層内を移動する水の移動性を同時にモニターすることが出来る試料保持装置を開発し、それを用いて温度変化解析を実施することで、角層の構造と水に対するバリア機能の関係性について詳細に解析した。これらの結果について報告する。

## 2. 手法

### 2.1 電子線回折法による皮膚角層の構造と経皮水分蒸散量 (TEWL) の関係解析

#### 2.1.1 グリッドストリッピング法による角質細胞の採取

加速電圧が 100 kV 程度かそれ以上の一般的な透過型電子顕微鏡を用いることで、角化し扁平状になった角質細胞(厚さ 200 nm 程度)由来の電子線回折像を取得することができる。しかし、角質細胞が 2 個以上重なると、もはや解析可能な回折像を取得することは出来ないため、角質細胞 1 個を中空の状態(電子線の透過経路に支持基盤や接着剤の膜がない状態)で保持し、電子顕微鏡内に固定する必要がある。この試料条件を達成するのが、Pilgram らが開発したグリッドストリッピング法である[32]。我々はこの方法を参考にし、独自にグリッドストリッピング法による試料採取の方法を確立した。以下に、本研究で行ったグリッドストリッピング法による試料採取の方法について、詳細を述べる。

電顕観察用金属グリッド(HH600, 日新 EM)に対し、酢酸エチルに溶解させた感圧型の接着剤(ポリシク 5423A, 三洋化成)を 1~2 滴塗布し、直ちに過剰分を濾紙で吸い取って、グリッドの金属格子部にのみ接着剤を塗布した。その後、常圧下で軽く乾燥させたのち、溶媒を完全に除去するため、グリッドをロータリーポンプ真空下において一昼夜以上保存した。角質細胞は、インフォームドコンセントの得られた健康な日本人男性被験者(22~32 歳)の角層より採集した。この一連の手法に関しては、関西学院大学におけるヒトを対象とした疫学調査・生命科学実験倫理委員会より承認が得られている。

まず皮脂や汚れを除去するために、角質細胞を採取する部位の皮膚表面をうすい洗剤で軽く洗浄した後、ぬるま湯でよくすすいで 20 分間 25℃程度に設定された室内で順化させた。その後、通常のコロテープによる角層剥離(テープストリッピング)を 3 回実施し、最表層数層の角質細胞を除去した。これは角層の最表層には、汚れや皮脂などが陥入しており、それらにより細胞間脂質の配列構造に影響を受けた角層を除去するための措置である[32][54]。4 回以上のテープストリッピングは、特に角層が薄い顔面部などでは痛みなどが伴う可能性があるため、今回は実施しなかった。3 回のテープストリッピングを行った後、直ちに接着剤を塗布したグリッドを用いて角質細胞を採取した。図 6 にグリッドストリッピング法によって採取され、白金パラジウム膜を蒸着した角質細胞の走査型電子顕微鏡(SEM)写真を示した。電顕観察用グリッドの六角形の金属格子部に接着剤が塗布され、そこに角質細胞が付着している様子が観察された(図 6a)。さらにグリッドの裏面側から SEM で観察すると、グリッド孔部分には接着剤の膜は形成されておらず、角質細胞が中空の状態で保持されていることが確認された(図 6b)。

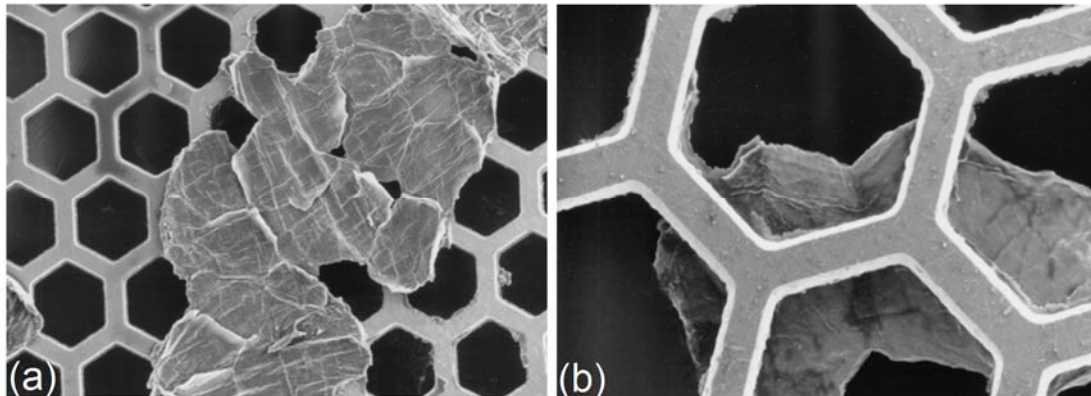


図 6 グリッドストリッピング法にて採取された角質細胞

図はグリッドストリッピング法にて採取された角質細胞を、(a)グリッド表面側からと、(b)グリッド裏面側から SEM で観察した様子を示している。(a) 角質細胞の体内側表面の皺状構造が観察できる。(b) さらにグリッド裏面側から観察した角質細胞表面（体外側表面）にもわずかな皺模様が観察されており、接着剤の膜によって金属グリッドの孔が閉塞されることなく、中空の状態で角質細胞が採取されていることが確認できる。

作製した角質細胞が付着したグリッドを用いて、(i) 電子線のビームダメージが角質細胞の構造にどのような影響を及ぼすのかを評価する実験を、および(ii) 6 名の被験者の額、頬、前腕内側部より角質細胞を取得し、部位による構造特性の違いや同時に測定した TEWL 値との相関性を解析する実験を実施した。

### 2.1.2 常温下での電子線回折実験

角質細胞の電子線回折実験は、透過型電子顕微鏡(JEM-1400, 日本電子)を用いて実施した。電子線の加速電圧を 100 kV(波長 $\lambda=0.0037$  nm)に設定し、グリッドストリッピング法により得られた試料を電子顕微鏡内部に挿入して、そこに直接電子線を照射して室温下で回折像を取得した。装置設定上のカメラ長を 150 cm にし、金の単結晶の(2, 0, 0)面の反射( $d=0.204$  nm)を用いて、回折像の  $s$  値( $s=2\sin\theta/\lambda$ ,  $2\theta$ : 散乱角,  $\lambda$ : 電子線の波長)を補正した。また、他の角質細胞に電子線を照射しないようにするため、電子線の照射面積を  $500 \mu\text{m}^2$  程度に制限し(角質細胞 1 個の面積はおおよそ  $1000 \mu\text{m}^2$  [55])、フラックス密度を  $0.5\text{--}5 \text{ e}\cdot\text{nm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  に、1 データあたりの露光時間を 0.5 sec に設定して実験を実施した。さらに試料に照射される電子線の平行性を確保するため、電子線が結像する位置の照射領域のほぼ中央付近に、 $8.4 \mu\text{m}$  程度の直径を持つ制限視野絞りを挿入して回折像を取得した。これにより 1 つの回折像には、1 つの角質細胞の  $55 \mu\text{m}^2$  程度の表面領域の構造情報が含まれることになる。検出器にはイメージングプレート(IP)や高感度 CCD カメラ(ES500W Erlangshen, Gatan)を用いた。

以上のような設定の下、まず、試料グリッドの外枠に電子線が照射されるように試料ステージを移動し、電子顕微鏡の観察モードを実像モード(観察倍率 $\times 10\text{k}$ )に設定して実像観察を行った。電子線が照射されていない角質細胞からのみ回折像を取得するため、グリッド外枠から順にジグザグ状に試料ステージを移動させて角質細胞を探索した。一旦、角質細胞が視

野内に観察されれば、ビームダメージを避けるため、ただちに TEM の照射系に電子線シャッターを挿入した。その後、観察モードを回折モードに切り替え、シャッターを開くとともに試料及び検出器に露光を開始して回折像を取得した。その後、電子線のビームダメージを解析する実験においては、シャッターを使用せずに角質細胞に対して連続的に電子線を照射し、一定の時間間隔で回折像を取得して、その構造の変化の様子を解析した。また、ヒトの体の部位による角層構造の違いを解析する実験においては、回折像の取得後再び実像モードに切り替え、試料ステージを移動して別の角質細胞を探索し、上記の操作を繰り返して複数の角質細胞より回折像を取得した。おおよそ 1 グリッドあたり 20～30 個の角質細胞由来の回折像を取得し、回折像より得られる各構造パラメータを平均化することで、角質細胞の部位間の構造上の違いを解析した。最後に、試料の Z 軸方向(レンズの光軸方向)の位置情報を取得し、後の解析において回折像の  $s$  値の補正を行った。図 7 に観察された角質細胞由来の電子線回折像の代表的なパターンを示した。



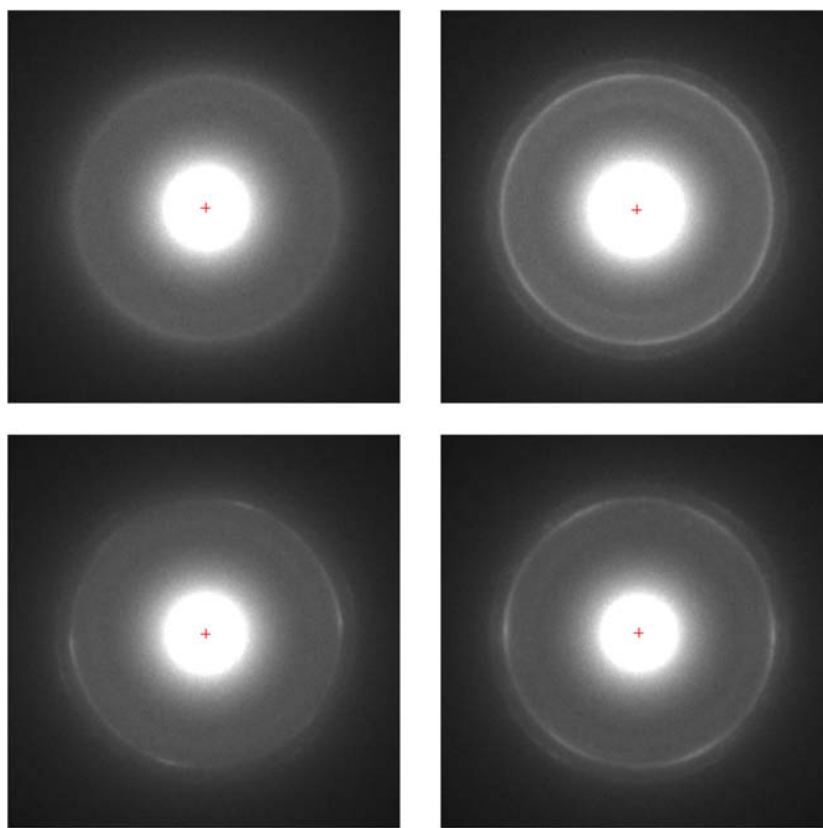


図 7 代表的な角質細胞由来の電子線回折像

様々なヒトの、様々な部位より採取された角質細胞由来の電子線回折像を示した。電子線の強度が強いところが白色で、弱いところが黒色で示されている。中央付近の白丸は電子線のダイレクトビームによるものであり、その周りのリングやアーク、スポット状のパターンが角質細胞の細胞間脂質やケラチンなどの構造に由来するものである。図から明らかなように、二重、三重のリング状の回折像がはっきり確認できるものや、リングが途切れてスポット状になっているもの、リング自体がはっきり確認できないものなど、回折像のパターンは多岐に渡る。このような回折像の特徴より、角質細胞由来の回折パターンは不均一であり、構造の多様性が大きいことがわかる。中央の+印は回折リングの位置から読み取ったビーム中心の位置をあらわす。

### 2.1.3 電子線回折のデータ解析

取得した電子線回折像について、まず得られたリングもしくはアーク状の回折パターンからビーム中心の位置を割り出し、同一周回上で方位角方向に積算し、さらに円周長で規格化して1次元化プロファイルに変換して解析を行った(図 8a)。ここで説明のため、 $s=2.4 \text{ nm}^{-1}$  付近の Hex 及び Ort 構造由来の回折ピークを Pk24、 $s=2.7 \text{ nm}^{-1}$  付近の Ort 構造由来の回折ピークを Pk27 とする。細胞間脂質の配列構造については、1次元化プロファイルにおける Ort 及び Hex 構造由来の回折ピークを以下の(1)、(2)式のようなガウス関数もしくはローレンツ関数とベースライン関数でフィッティングし、ピーク中心や面積、ピークの半値幅を算出した。ガウス関数(1)、ローレンツ関数(2)でのフィッティング式を以下に示す。

$$I(s) = \sum_i \frac{I_i}{\sqrt{2\pi}\sigma_i} \exp\left(-\frac{(s-s_i)^2}{2\sigma_i^2}\right) + as^{-n} + b \quad \dots (1)$$

$$I(s) = \sum_i \frac{I_i\sigma_i}{4(s-s_i)^2 + \sigma_i^2} + as^{-n} + b \quad \dots (2)$$

ここで、 $I_i$  は散乱強度の比例係数、 $s_i$  はピークの中心位置、 $\sigma_i$  はピークの半値全幅を表す。また、 $a$ 、 $b$ 、 $n$  については、ベースラインをフィッティングした関数の各パラメータである。フィッティングの適合性から判断して、上記のモデル関数のうち、X線散乱プロファイルにおける Pk24 ではローレンツ関数を、それ以外のピークは全てガウス関数を用いて解析を実施した。

図 8 に代表的な角質細胞由来の電子線回折 1 次元化プロファイルを示した。Pk24 はすべてのプロファイルで確認されたのに対し、Pk27 が小さくほとんど同定できないようなプロファイルも観察された(図 8a)。Pilgram らは、バリア機能が低下していると考えられる病変皮膚では、Ort 構造が少なくなっていることを報告しており[37]、従って Ort 構造の存在率は TEWL 等のバリア機能に影響する可能性が示唆される。そこで、まず Pk24 に対する Pk27 のピーク面積の比を見積もることで、Ort 構造の存在率を算出した。ただ、この計算結果は、ベースラインの設定方法に大きく依存し、ベースラインやピークの同定が難しい電子線回折プロファイルでは大きな誤差を含む可能性がある。そこで、Ort 構造の出現頻度を数値化するため、図 8b のように Pk24 から Pk27 が出現する  $s$  の範囲で 2 階微分を取得し、その符号の反転の様子から Pk27 の存在の有無を判定した。これら 2 種類の方法で、角質細胞内に存在する Ort 構造の解析を行った。

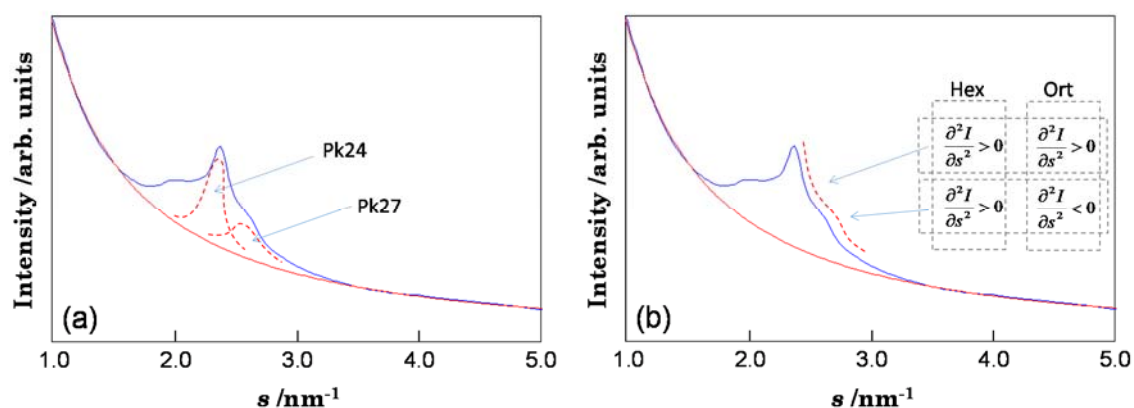


図 8 角質細胞の電子線回折像の 1 次元化プロファイルとその解析の方法

前腕内側部より採取した角質細胞の電子線回折像の 1 次元化プロファイルを示した。縦軸が電子線の回折強度 arb. units、横軸が散乱ベクトル  $s \text{ nm}^{-1}$  であり、青色実線が散乱プロファイル、赤色実線が散乱プロファイルのベースラインのフィッティング結果をあらわす。

(a) 角質細胞由来の 1 次元化プロファイル ( $s=1 \sim 5 \text{ nm}^{-1}$ ) には、細胞間脂質の Hex 及び Ort 構造の両方の側方配列構造に由来するピーク (Pk24) と、Ort 構造のみに由来するピーク (Pk27)、Pk24 のやや小角側に位置するピーク (ケラチンや Liq 相由来と考えられている) の主に 3 つのピークが出現する。図内の赤色点線が、ピーク分離した結果同定された Pk24 と Pk27 を示す。(b) また、Pk27 の出現を確認するため、1 次元化プロファイルの Pk24 から本来 Pk27 が出現する位置 (図内赤色点線) までの 2 階微分を取得し、符号が変化する点の有無から Pk27 の存在を判定した。この回折像では、目視でも Pk27 付近の盛り上がりが確認でき、Ort 構造の存在が確認されているが、実際には目視で判別できないようなパターンも多く、当手法による判定が必要であった。

図 7 から明らかなように、角質細胞の電子線回折像のパターンは、リングやアーク、スポット、或いはそれらの組み合わせなど多岐に渡る。我々が予備的に実施した角質細胞の電子線回折実験では、腕に比べて額や頬でスポット状の回折パターンが多く得られ、またアトピー性皮膚炎の症状を持つ被験者から採取した角質細胞においても、同様にスポット状の回折パターンが多く得られることが示唆された。リングやスポット、アークなどの回折像の方位角分布からは、細胞間脂質炭化水素鎖の側方配列のドメイン構造に関する情報が得られる。一般的には、ドメイン構造が存在すると、その境界では格子欠陥による隙間が生じると考えられ、ドメイン構造の分布の様態が物質の膜間透過、すなわちバリア機能に少なからず影響を与えている可能性が考えられる。従って TEWL との相関を考える上で、当パラメータは大変興味深い。しかしながら、このような 2 次元の回折強度分布を定量的に評価する適当な分析手法は今のところ確立されておらず、従って、下記の 2 種類の方法により、回折パターンのスポット性について定量的に評価することを試みた。

図 9 は、電子線回折像 (a) とその Pk24 の位置での電子線強度の方位角依存性 (b) を示している。図 9b の方位角依存性では、回折像が均一なリング状であればより平坦な強度分布プロファイルとなり、スポット状であれば凹凸のある強度分布プロファイルとなる。そこで、このプロファイルの平坦性を定量的に評価することで、回折パターンのスポット性について評価することを試みた。具体的には、次式 (3) のように同一周回上で順にそれぞれの角度  $\theta_n$  における回折強度値を積算していき、 $T(\theta_n)$  と  $\theta_n$  の相関係数を計算して、回折強度の方位角依存性を定量化することで、回折パターンのスポット性について定量的に評価した。

$$T(\theta_n) = \sum_i^n I(\theta_i) \quad \dots (3)$$

この手法は、モデル直線からのズレの程度を求めることで、回折パターンのスポット性を評価しようとするものである。通常、このような直線からのズレの程度を評価する場合は、平均強度直線からの分散が用いられる。しかし、当解析に分散をそのまま用いると、回折強度分布プロファイル内に鋭いピークが数個しか存在しないような場合に、そのスポット性を低く見積もってしまう可能性がある。そこで (3) 式のような回折強度の積算関数を求め、 $\theta_n$  との相関係数を求めることにより、回折像のスポット性を評価する手法を採用した。

この手法の問題点は、逆に鋭いピークが回折強度プロファイル内に多数存在するような場合には、スポット性を低く見積もってしまう可能性があることである。そこで、方位角の回折強度プロファイル中に、ある閾値以上の強度値と、閾値以下の幅を持つピークが 1 つでも存在するかどうかを判定することで、スポット状の回折像の観察頻度を算出する方法 (図 9b 挿入図) についても検討した。これらの手法による解析結果を、部位間での構造比較や TEWL との相関解析に適用した。

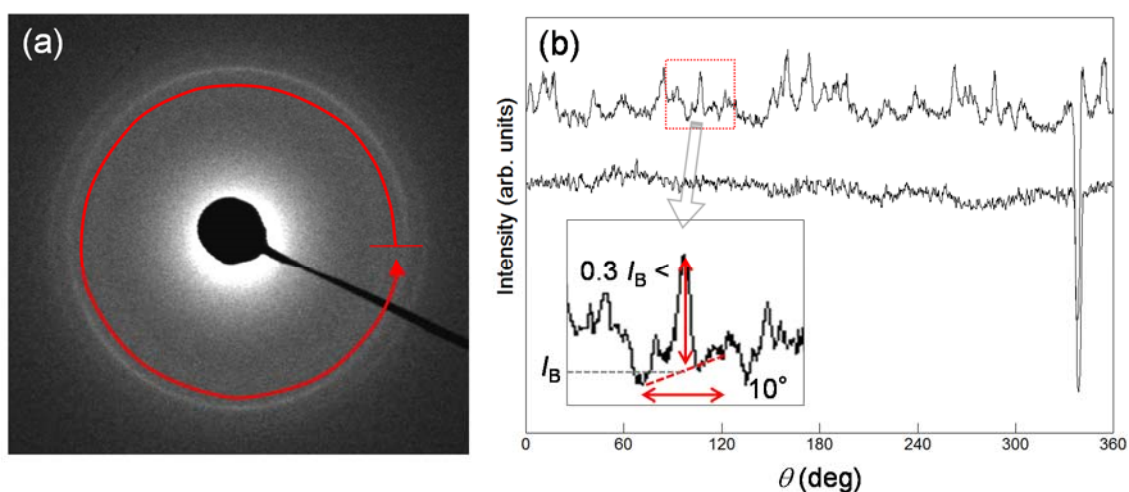


図 9 細胞間脂質側方配列ドメイン構造の異方性の解析手法

代表的な角質細胞由来の電子線回折像 (a) と、それらの回折像の Pk24 の位置での強度の角度分布プロファイル (b) を示した。a 図の点線の位置における矢印の方向の強度分布が b 図で示されている。b 図の角度分布プロファイルでは、縦軸に回折強度、横軸に適当な個所 (a 図の点線矢印の始点の位置) からの方位角を示し、特徴的な 2 つのパターン (上: スポット状の回折像、下: リング状の回折像 (a 図に対応)) を示している。この強度分布プロファイルの凹凸の程度を解析するため、方位角  $0^\circ$  から  $\theta$  まで強度値を積算して得られる関数  $I(\theta)$  と  $\theta$  との相関係数を計算する方法と、角度分布プロファイル内に適当な閾値以上のピークが存在するかどうかを判定する方法 (b 内の挿入図) の 2 種類の解析を行った。

## 2.2 X 線回折法による皮膚角層の構造と TEWL の関係解析

### 2.2.1 X 線回折実験における角層試料の調製

電子線と比べて、X 線の角質細胞に対する散乱は弱いので(表 1 参照)、X 線回折では非侵襲量の試料で実験を行うことは難しい。解析可能な強度を持つ回折像を取得するためには、数 cm<sup>2</sup>程度の表面積を持つ角層全層(角質細胞 10 層程度)を試料として用いる必要がある。通常このような角層試料の調製には、真皮を含む皮膚組織全体の摘出措置が避けられず、従って我々は、美容皮膚科で脂肪吸引等の痩身施術後、余って不要となり切除され、廃棄される皮膚を実験に用いた(Biopredic, France より購入)。皮膚の摘出後、Biopredic 社において直ちに表皮層のみが機械的に剥離され、トリプシンなどの酵素処理で顆粒層以下の細胞を分解した後、角層のみが分離抽出される。この角層の調製法に関しては、Bouwstra らの論文に詳細が記載されているのでここでは割愛する[31]。摘出された皮膚を実験等に用いることについては、被験者よりインフォームドコンセントが得られ、フランスの法律に基づいて皮膚が採取されていること、また HIV や肝炎等のウイルスに感染していないことが Biopredic 社において確認されている。さらに、関西学院大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究安全倫理審査委員会においても、当実験においてこれらの角層試料を使用することが、問題ないと確認されている。

購入したヒト角層試料は、まず室温下の油回転ポンプ真空槽で 1 日以上乾燥処理し、実験で使用するまでそのままの状態に保管した。実験で使用する 1 日前に真空槽から角層を取り出し、適当な大きさにカットした角層の乾燥重量を測定し、そこに過剰な水を付加して水分が過飽和状態となるように調製した。その後、乾燥室素気流下において、質量を測定しながら再び適当な水分量になるまで乾燥させ、目的の量の水分が角層に含まれるように調整して実験に供した[56]。

### 2.2.2 外部環境 2 分型薄膜構造解析用試料セルの開発とそれを用いた X 線/TEWL 同時測定について

X 線の角層に対するビームダメージは電子線に比べて格段に低いので、X 線による角層の構造解析実験では同一試料の同一箇所連続的に X 線を照射して、その構造の時間変化を解析することが可能となる。また、実験は大気圧下で実施することができるので、試料周りの環境を、様々な条件に設定して実験を展開することができる。この X 線回折法の特長をうまく活かし、我々は、八田らが開発した様々な溶液を作用させたときの角層の構造変化を連続的に解析することが出来る“溶液セル”(図 10)を用いることで、有機溶媒が細胞間脂質の配列構造を溶解していく様子などを明らかにすることに世界で初めて成功している[35]。

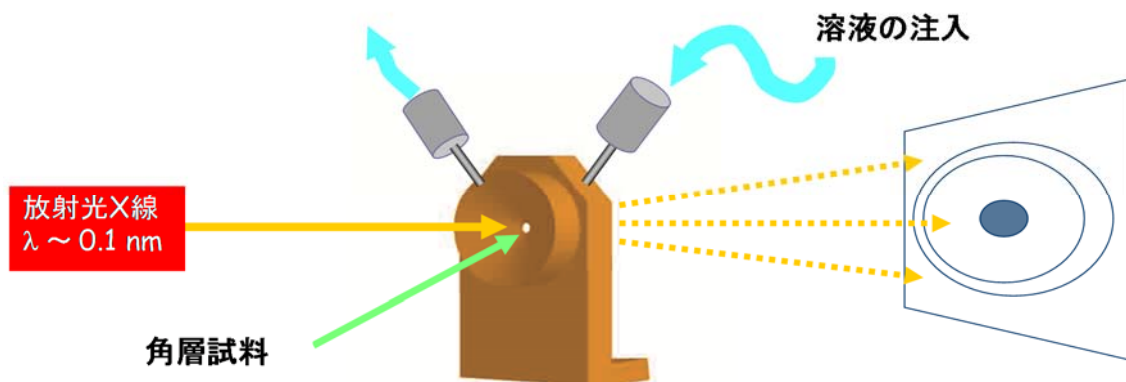


図 10 溶液セルの概略図

溶液セルを用いた X 線回折測定概略図を示した。セル内部には中央に穴が開いたガラスウールが充填されており、そこに角層試料を圧縮して固定する仕様となっている。セル内に注入された溶液は、ガラスウールの隙間を通して試料に到達し、試料周りを過剰な溶液で満たしつつ、溶液排出口へ導かれる。溶液を作用させても試料が動かず、連続的に同一部位からの X 線回折像を取得することができる。これにより、構造に局所差がある角層のような試料においても、浸透する溶液の様子やその際に生じる角層の微細な構造の変化を高感度に捉えることが可能になった。

この溶液セルは、試料の位置を精度よく固定することができ、よって局所差の大きい角層のような生体試料であっても、溶液の浸透による角層の微細な構造変化を高感度で捉えることができる。我々は、この溶液セルの特徴を活かしつつ、より広範囲の実験を実現することができる“外部環境 2 分型薄膜構造解析用試料セル (外部環境 2 分セル)” (特開 2013-205077) を開発した (図 11)。この外部環境 2 分セルは、溶液注入時にも角層試料が動かないという溶液セルの特徴をそのまま継承しており、さらに角層のようなシート状の試料をシート状のままセル内に固定する仕様にする事で、試料の表裏の環境を自在に制御しつつ、同時に X 線回折等による構造解析を実施できることが大きな特長である。試料は入射 X 線に対して 45° 程度傾けて設置する構造となっており、これにより、角層試料の表面側だけに溶液を塗布するというような、より実際に近い薬剤の皮膚への塗布環境下における角層の X 線構造解析実験を実施することができる。さらに、角層の下部を水で満たし (体の内部環境を想定)、上部から TEWL を測定しつつ、また同時に X 線回折による構造解析を実施するというような“機能”と“構造”の同時解析が可能となった。前項で述べたように、角層中の細胞間脂質分子は、角層面に対して垂直に配向し、さらに角層面と平行なラメラ構造を形成している。よって、このような斜入射環境での X 線回折実験においては、ラメラ構造由来の回折ピークは上下方向に、細胞間脂質側方配列構造由来の回折ピークは左右方向に出現する。このような配向性に関する情報が得られることも、外部環境 2 分セルの一つの特長として挙げられる。



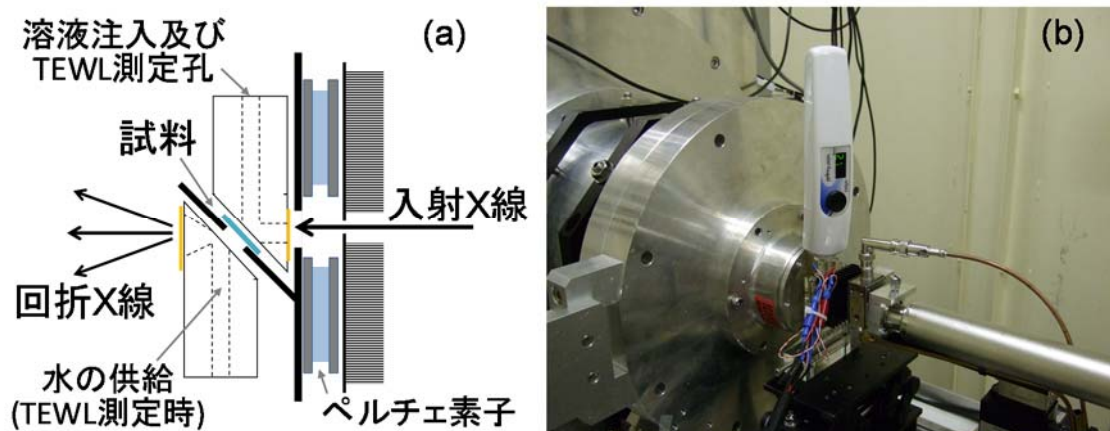


図 11 外部環境 2 分セルの概略図と X 線/TEWL 同時測定実験の様子

(a) 外部環境 2 分セルの中央部にシート状の試料を入射 X 線に対して  $45^\circ$  程度傾けて設置し、その上部には溶液注入口及び TEWL などの検出器の設置パーツが、下部には水などの溶液のリザーバとなるパーツが接続される。試料はペルチェ素子が連結した中央に穴が開いた金属板 (a 図の太線) に設置されており、温度を自在に変化させることが出来る。また試料の乾燥を防ぐため、X 線の入射窓はカプトン膜でカバーされた構造となっている。(b) SPring-8 BL03XU (第 2 ハッチ) における当試料セルを用いた実際の X 線及び TEWL 同時測定実験の様子を示した。b 図中央に設置された外部環境 2 分セルの上部に、開放型の TEWL 測定プローブ (VapoMeter) が接続されている。図の右側 (上流側) のパスより入射された X 線が、中央の試料セル内の角層試料で回折され、左側の真空パスの下流側に設置された検出器で検出される。

外部環境 2 分セルの内部には、X 線が透過可能な穴が開いた試料保持用の金属板が入射 X 線に対して  $45^\circ$  程度傾けて設置されている。さらに、その金属板とペルチェ素子及びヒートシンクを直接連結することで、シート状試料の精度良い温度制御を実現した。試料の温度は、試料直近の金属板裏面に設置された白金測温抵抗器で測定され、またペルチェ素子の制御にはペルチェコントローラドライバ (TDC-1010A、CELL) を用いた。

X 線/TEWL 同時測定実験では、皮膚の表面側を上にしたシート状の角層試料を外部環境 2 分セルの中央に設置し、下部パーツを蒸留水で満たして角層下部の裏面側に水が接するように固定した。試料より上部の各パーツの接続箇所にはシリコンゴム製のワッシャーを取り付け、内部をほぼ完全に密閉できる構造とした。さらに、上部パーツに専用のアダプタを接続し、そこに TEWL の測定プローブを直接取り付けて、角層試料の昇温過程における TEWL 値の変化を連続的に計測した。同時に角層由来の X 線回折像も取得し、両者の温度変化特性の対応関係について詳細に調べた。なお、TEWL の測定には、閉塞型ポータブル水分蒸散計 (VapoMeter、Delfin) を用いた[57][58]。

VapoMeter により測定される TEWL の値は、以下の(4)式のようなフィックの拡散式に基づき算出される。

$$\frac{dm}{dt} = -D \cdot A \cdot \frac{dp}{dx} \quad \dots(4)$$

ここで、 $m$  は移動した水分の質量、 $D$  は大気圧下における空気中の水分子の拡散係数( $D = 0.0877 \text{ g/m/h/mmHg}$ )、 $A$  は筒状の測定プローブの面積、 $x$  は測定位置と皮膚表面との距離、 $p$  は  $x$  位置での大気中の水蒸気圧を表す。TEWL 測定装置の計測プローブの内部には、皮膚表面から距離  $x$  の位置に温度湿度センサーが組み込まれており、その測定値の時間変化より  $dp/dx$  の値を見積もり、TEWL 値( $= 1/A \cdot dm/dt$ )に変換してアウトプットされる仕様となっている。X 線と TEWL の同時測定においては、同一温度において一定時間おきに TEWL 値を 3 回取得し、それらのデータの平均値を求めて TEWL 値の温度依存性を解析した。

### 2.2.3 X 線回折法

角層試料の X 線回折実験は、大型放射光施設高輝度光科学研究センター(SPring-8)のビームライン 03XU(フロンティアソフトマター開発専用ビームライン;FSBL)第 2 ハッチ及び 40B2(構造生物学Ⅱビームライン)にて実施した(図 12)。これらのビームラインの詳細については、他の文献に記載されているのでここでは省略する[59][60]。X 線のエネルギーを 14 keV(波長;0.0886 nm)、カメラ長を約 550 mm に設定し、検出器には、300×300 mm<sup>2</sup>の検出面積を持つ高速イメージングプレート X 線検出器(R-Axis VII, RIGAKU)を用いて小広角同時測定を実施した。また、サンプル位置における X 線の照射領域は、おおよそ 0.2 × 0.2 mm<sup>2</sup>に設定した。さらに両ビームラインでおおよそその X 線強度を合わせるため、03XU では Mo のアッテネータを使用した。1 データの露光時間を 30 秒に固定し、動的実験におけるデータの取得間隔は、当高速イメージングプレート X 線検出器の最速データ取得間隔(IP-1 枚使用でレーザーシングルの読み取り設定時)である 180 秒に設定した。回折光の逆光子空間の  $s$ ( $s = (2/\lambda)\sin(2\theta/2)$ ,  $\lambda$ は X 線の波長,  $2\theta$ は X 線の散乱角)値は、無水コレステロール粉末のラメラ反射の面間隔( $d=3.39 \text{ nm}$ )を用いて校正した。取得した X 線回折像については電子線回折実験と同様に、方位角方向に 1 周積算して得られた 1 次元化プロファイルの細胞間脂質由来ピークに、(1)および(2)式のモデル関数をフィッティングし、そのピーク位置や面積、ピーク幅を定量的に解析した。なお、X 線と TEWL の同時計測においては、試料の昇温速度を 0.6°C/min とし、20°C から 70°C の温度範囲で 1.8°C 間隔(即ち 180 秒間隔)で回折像を取得して、角層構造の温度依存性を解析した。

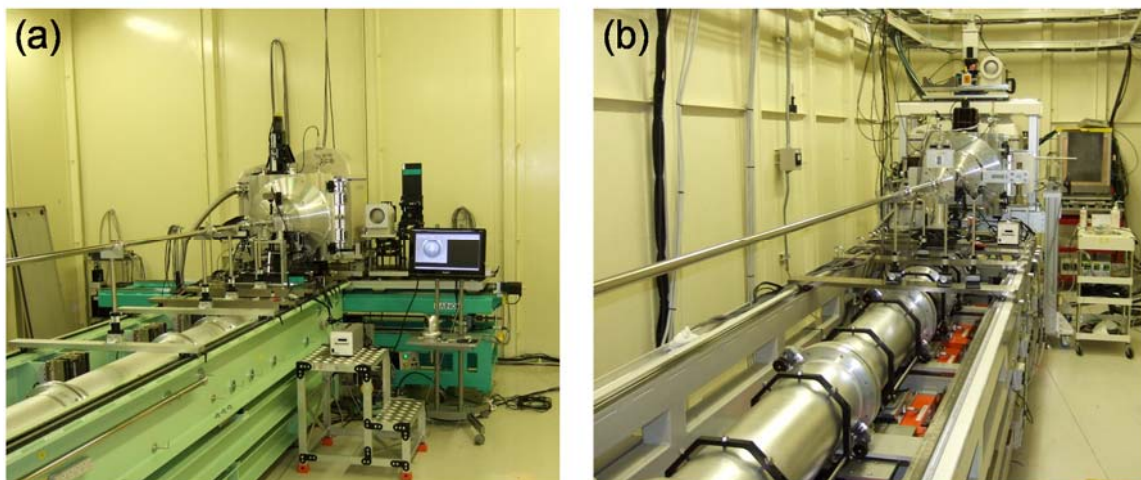


図 12 SPring-8 における X 線回折実験の様子

SPring-8 ビームライン 03XU (第 2 ハッチ) (a) 及びビームライン 40B2 (b) のハッチ内にて、上流側より撮影した。どちらのビームラインにおいてもほぼ同様の計測システムが構成されており、角層試料の小広角同時解析が実施できる。

### 3. 結果

#### 3.1 電子線回折法によるヒト皮膚角層の構造と TEWL との関係解析

##### 3.1.1 常温下における電子線回折手法の確立 ―ヒト角層に対する電子線ビームダメージの影響解析―

Pilgram らによって導入された角層の電子線回折法は、ヒトの角層の細胞間脂質の配列構造を非侵襲的に解析することができる非常に画期的な分析手法であった[32][37][61]。角層に対する電子線のビームダメージは大きく、一般的な電子線回折の方法では角層の構造が直ちに破壊されてしまい、角層本来の構造情報を得ることは難しい。これに対し、Pilgram らは試料を極低温(液体窒素温度)に冷却することで、電子線のビームダメージを抑制できることを報告している[32][37][61]。実際に我々がこの手法でビームダメージの影響を評価したところ、室温下における測定と比較して大幅にビームダメージによる試料の構造変化を抑制できることがわかった。しかしながら、一般に、角層を冷却すると細胞間脂質は相転移することが知られており、常温下における角層の構造情報が失われる可能性がある。また、実験精度の低下の大きな要因となる大気中の水蒸気による氷晶の出現を抑制するため、①室温下での試料設置、②電子顕微鏡内部(高真空下)への試料の移動、③極低温への冷却(温度が安定するのに 30 分程度待機することが必要となる)、④再び室温に戻して試料を取り出す、という一連の手続きを試料交換の度に踏む必要があり、結果的にこのことが当手法の大きな利点である汎用性を大幅に低下させていた。そこで我々は、電子線の照射量を大幅に低減化し、試料のビームダメージを極力抑制することで、室温下での角層の電子線回折実験が実現可能かどうか検討した。

我々はまず、電子線の照射量を抑制するために、Pilgram らが用いた写真フィルムより高感度の検出器の導入を検討した[32][37][61]。高感度検出器としては、イメージングプレートや CCD カメラを用いた。特に CCD カメラは、通常のボトムマウントタイプのものではなく、感度特性や側方分解能に優れるサイドマウントタイプの高感度デジタル CCD カメラを採用した。さらにビームシャッターを用いることにより、回折像取得時以外の露光を極力抑制するよう努めた。これらの処置により、従来法よりも電子線の照射量をおおよそ 1/10 程度にまで抑制できることがわかった。

このような実験条件下における、室温下での角質細胞に対する電子線のビームダメージの影響を評価した実験結果を、図 13 に示した。この実験では電子線のフラックス密度を  $0.5 \text{ e} \cdot \text{nm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  に設定し、連続的に角層試料に電子線を照射して一定の時間間隔で回折像を取得した(図 13 a-d)。得られた回折像を同一円周上に沿って積算して一次元化し、(1)、(2)式を用いてモデル関数をフィッティングして細胞間脂質由来のピークである Pk24 と Pk27 のピークトップの  $s$  値を求めた。電子線の照射量と  $s$  値の変化の関係について、図 13e にまとめた。

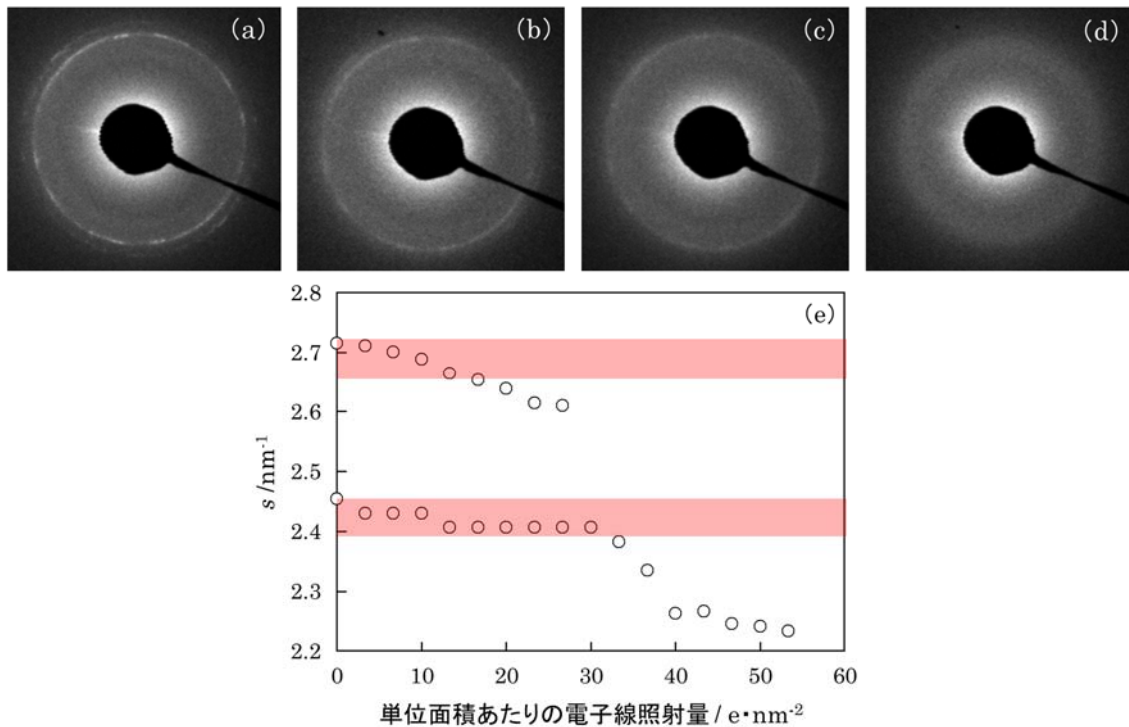


図 13 電子線のビームダメージによる角質細胞由来の回折像の変化の様子 (a-d) と Pk24 と Pk27 の  $s$  値の変化 (e)

(a-d) 角質細胞に電子線を照射し続けた時の、回折像の変化の様子を示した。それぞれの回折像の単位面積あたりの電子線照射量は (a)  $3 \text{ e/nm}^2$ 、(b)  $20 \text{ e/nm}^2$ 、(c)  $30 \text{ e/nm}^2$ 、(d)  $50 \text{ e/nm}^2$  である。(e) 縦軸を  $s$  値に、横軸を角質細胞に対する電子線の照射量に設定し、ビームダメージによる Pk24、Pk27 両回折ピークのピーク位置  $s$  の変化の様子を示した。図中の 2 か所の帯は X 線回折や、電子線回折においてビームダメージがほぼない状態で観察される Pk24 及び Pk27 の  $s$  値のおおよその範囲を示した。

図 13 a-d の一連の回折像の変化の様子より、角質細胞に電子線を照射し続けると、まず広角側の回折ピーク(Pk27)が小角側へとシフトしてやがて消失し、その後、内側の回折ピーク(Pk24)が小角側へとシフトして、最後にフェードアウトしていくような変化を示すことがわかった。それらの回折像を 1 次元化し、電子線の照射量に対するピークトップ位置の変化を詳細に解析した結果を図 13e に示した。この図より電子線の照射後間もなく Pk27 が徐々に小角側にシフトし、 $25 \text{ e/nm}^2$  程度の照射量で完全に消失、続いて  $30 \text{ e/nm}^2$  程度より Pk24 が小角側にシフトして、 $55 \text{ e/nm}^2$  付近まで一定の値を取ることがわかった。

X 線回折や、ビームダメージが無い条件での電子線回折実験において観測される角質細胞の Pk24、Pk27 の  $s$  値は、個体差にもよるがおよそ図 13e で示した帯線の範囲内に収まっている。これらの結果より、今回の通常観察時の電子線照射量である  $0.5 - 1.0 \text{ e/nm}^2$  という値での実験においては、ほぼビームダメージは問題ないことがわかった。上述のように、試料を液体窒素温度まで冷却した場合は様々な処理が必要となり、複数グリッドからデータを

取得する場合の 1 グリッドあたりのデータ取得時間(20～30 データ)はおおよそ 3～4 時間程度であるが、常温下での測定では、おおよそ 1 時間程度で取得することができ、よって、数多くのデータを取得し、統計学的な処理を要する本手法においては、60～70%の時間短縮は非常に有効である。従って本検討により、室温下での角層試料の電子線回折法が実現可能であることがわかり、当手法の汎用性を大幅に向上させることに成功した。

### 3.1.2 電子線回折法によるヒト角層構造の解析手法の確立とそれを用いた角層構造と TEWL の関係解析

哺乳類の多くには皮膚角層が備わっているが、その構成成分や物性は、種によって異なっていることが知られている[62][63]。また最近の研究によると、角層内に存在する細胞間脂質の成分や配列構造にも種差があることが報告されており[64][21][23]、角層の多様性が明らかにされつつある。さらに、実際に我々が角層の構造を詳細に解析したところ、同一種、それ以上に同一個体であっても、構造上の差異(個体差、部位差、局所差)が少なからず存在しており、また角層内に含まれる水分の量や試料の調製法によってもその構造を変化させることがわかってきた(これについては 3.2.1 で詳細を報告する)[35][22]。このように多様性を持つ角層について、その機能(TEWL)との関係性を評価するためには、多くのヒトの様々な状態にある角層を網羅的に統計学的に解析することが必要不可欠となる。このような解析を実現するためには、試料を非侵襲的に採取することが必要不可欠となるが、この際に威力を発揮するのが電子線回折による角層の構造解析である。上述のように電子線回折実験では、グリッドストリッピング法を用いて角質細胞を採取するが、通常のセロテープによる剥離と同様、角層ほぼ 1 層分だけを採取することができ、非侵襲的な実験展開が可能となる。さらに、我々が確立した常温下での角層の電子線回折法を用いることで、従来法よりもより簡便に多量のデータを取得して、統計学的に角層の構造特性を分析することが可能となる。そこで我々は、当手法を用いて 6 名の被験者の異なる 3 部位(前腕内側部、顔面頬部、顔面額部)から角質細胞を採取し、それらの構造の個体差や部位差を解析し、また同時に TEWL を測定することで、構造と水に対するバリア機能の関係解析を試みた。

図 14 に、A～F の 6 名の被験者の前腕内側部より採取された角質細胞の電子線回折像を 3 パターンずつ示した。これらの回折像は意図的ではなくランダムにピックアップされたものである。また、この 6 名は、特に皮膚疾患が認められない健常な皮膚を持つ被験者である。図から明らかなように、同一時に、同一人の、同一部位の、同一深さから採取した角質細胞であっても、その回折像は様々なパターンを示し、角質細胞の構造はバラつきが大きいことが伺われた。よって、これらの構造を比較する際には、多くのデータを取得して統計学的に解析することが必要であることが示唆された。

また図 14 の回折像を観察すると、個人におけるおおまかな回折像の特徴を読み取ることが出来る。例えば、被験者 A の Pk24 の回折パターンはアーク状になっており、また被験者 F の Pk24 や Pk27 の回折パターンはスポット状に点在しているものが認められる。さらに、被験者 F の 1 枚目の回折像は全体的に白っぽくなっており、像のコントラストに違いがあるように見受けられた。Pk24 や Pk27 の強度や幅にも差異が認められ、従って、次にこれらの特徴を定量的に評価すべく、回折像を方位角方向に積算して 1 次元化プロファイルを作成し、Pk24 と Pk27 の強度比や Pk27 の有無を統計的に解析することを試みた。さらに、Pk24 の強度の方位角依存性の定量解析を実施した。



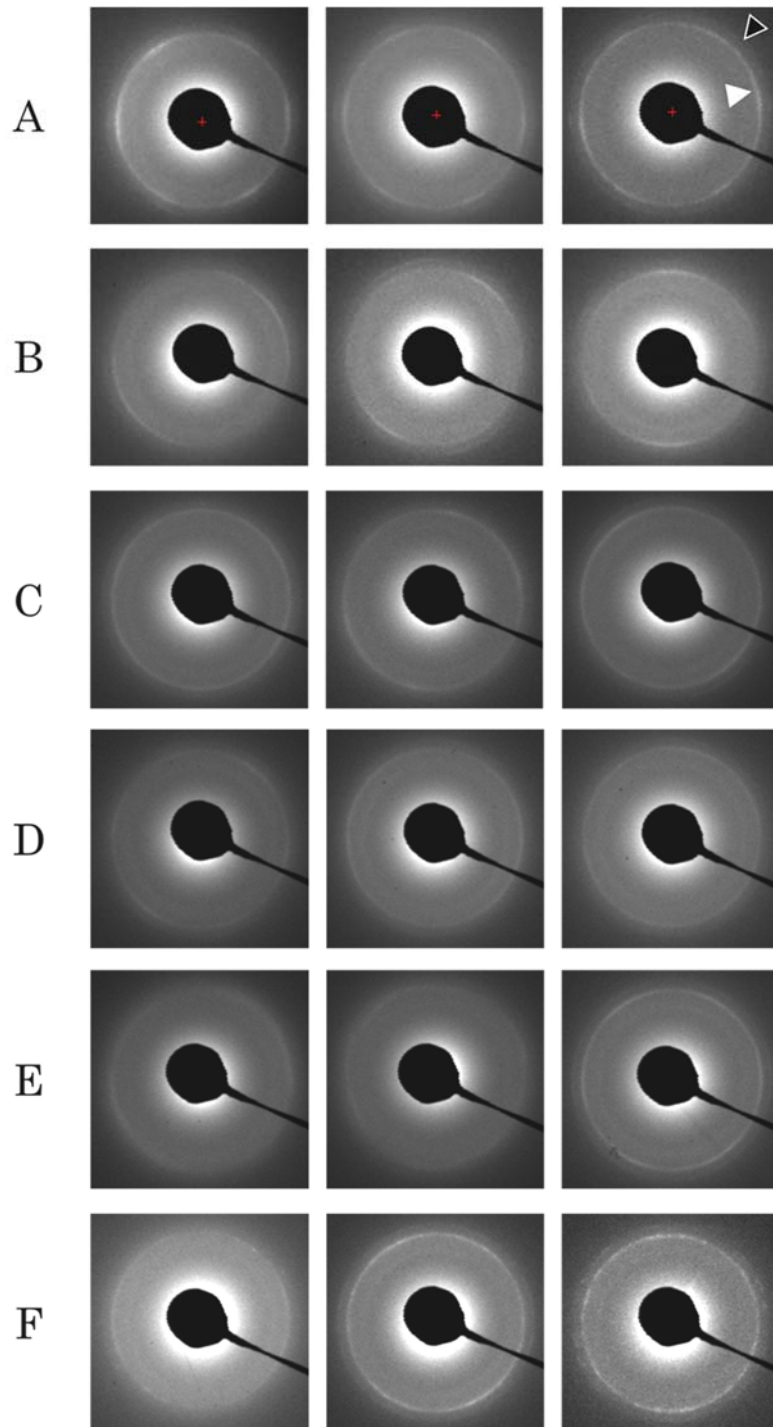


図 14 異なる 6 名の前腕内側部より採取された角質細胞の電子線回折像

上から順に、6 名の被験者（A～F）の前腕内側部から採取された角質細胞由来の電子線回折像を、3 パターンずつ示した。同一個体の同一部位から採取された角質細胞であっても、回折像は異なっており、構造のバラつきが大きいことがわかる。被験者 A の 3 枚目の回折像内に、Pk24 の位置を（△）で Pk27 の位置を（▲）で示した。



取得した電子線回折像を方位角方向に 1 周積算して 1 次元化し、得られたプロファイルについて Pk24 に対する Pk27 の強度比 (Pk27/Pk24; すなわち Ort 構造の存在量の指標となる値) を算出した結果を図 15a に、Pk27 のピーク形状から回折像の Ort パターンの出現比率 (すなわち Ort 構造の数的指標となる) を算出した結果を図 15b にそれぞれまとめた。これらの各データは、おおよそ 100~120 個の角質細胞より得られた回折像より計算された値である。図 15a より、Pk27/Pk24 については個体差があるものの、おおよそ額や頬で小さく (~10 %)、腕で高くなる (~20 %) 傾向があることが分かった。被験者 C については、この傾向とは一致しておらず、むしろ腕の方が Pk27/Pk24 値は小さくなっており、そのような特異な例も認められた。しかしながら、このような部位間の傾向については、別の 6 名で実施した実験においても同様の結果が得られており、高い再現性が確認されている (ここでデータは掲載していない)。またこの部位間の傾向について *t* 検定を実施したところ、*P* 値が額と腕の比較においては 0.0240、頬と腕の比較においては 0.0046 となり、統計学的に高い有意差が認められている。また同様に Ort パターンの数的評価においても、Pk27/Pk24 と同様個人差はあるが、額、頬で少なく (~40 % 程度)、腕で多くなる (~70 %) 傾向が認められた。図 15 a, b の結果がほぼ完全に対応していることから、今回使用した電子線の照射領域 (~55  $\mu\text{m}^2$ ) において、Ort 構造が存在する角質細胞にはほぼ一定の割合で Ort 構造が存在している可能性、すなわち Ort のドメインサイズは 55  $\mu\text{m}^2$  よりも十分小さいことが示唆された。X 線と比べて電子線回折の散乱のバックグラウンドは大きく、またピークの幅も広いので、ピークの同定には多くの時間を要し、さらにピーク面積の解析には大きな誤差が含まれる可能性がある。しかしながら、ピークの 2 階微分は、機械的に多くのデータから瞬時に取得することができ、よって、当手法を用いて簡便にピークの形状を解析することで、Ort 構造の準定量的な評価が可能であることがわかった。

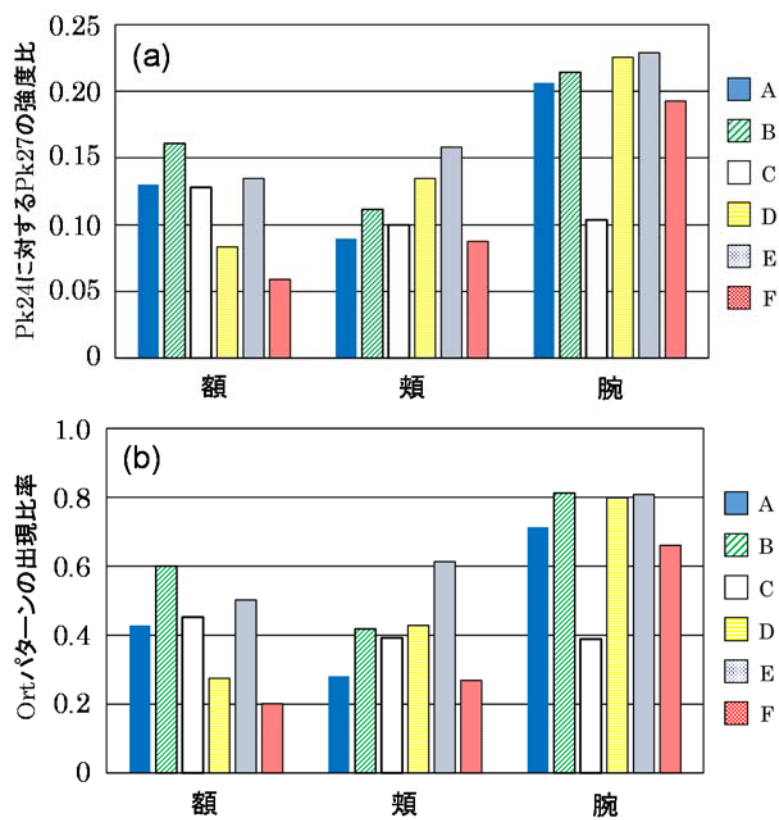


図 15 角層細胞間脂質の 0rt 構造の量的(a)及び数的(b)評価（個人差、部位差）

6名の被験者（A～F）の、額、頬、腕部より採取した角層試料の、Pk24に対するPk27の強度比の平均値（a）と、0rtパターンの出現比率（b）を示した。それぞれのデータはおおよそ100～120個の角質細胞より取得した回折像の平均値で構成される。個人間及び部位間において、両解析手法においてほぼ同様の傾向が認められた。

次に、回折像の観察時に予測された回折パターンのスポット性の程度の違いについて、その個体差や部位差を定量的に評価することを試みた。図 9 のように Pk24 の位置で方位角方向の回折強度の角度分布プロファイルを作成し、まず、ある特定の位置から周回方向にそれぞれの角度  $\theta_n$  における回折強度値を積算していき、 $T(\theta_n)$  と  $\theta_n$  の相関係数を計算することで、回折パターンのスポット性の程度について評価した。さらに、角度幅が  $10^\circ$  隔てた 2 点の範囲内において、その 2 点から見積もられたベースライン強度から 30%以上強い強度点がある範囲内に存在するかどうかをすべての角度領域においてスキャンし、回折パターンがスポット状かリング状かを判定して、それらの存在比率を見積もりスポット性の程度を定量評価した。なお、これらの閾値については、角質細胞の電子線回折像においてよく観察される回折スポットの形状から適当な値を見積もった。A~F の 6 名の被験者から得られた回折像(図 14 参照)のスポット性について、図 16a では相関係数による定量解析の結果を、図 16b には出現頻度による定量解析の結果をそれぞれ示した。相関係数による定量評価では、その値が大きい程スポットの程度が低く、逆に出現頻度解析では値が大きい程スポットの程度が高くなり、すなわち両解析手法においてその大小関係は逆転する。

図 16 より、まず被験者 E の額及び頬のスポット性が突出して高くなっていることが確認され、観察した回折像の半数以上がスポット状のものになっていることがわかった(図 16b)。さらに、部位間での違いに着目すると、額、頬に比べて腕では全体的にスポット性が低くなる傾向があることがわかった。スポット状回折パターンの出現頻度解析において、それぞれの部位について、6 名の測定値の平均値を算出し、部位間で  $t$  検定を実施したところ、額と腕の比較での  $P$  値が 0.0006 に、頬と腕の比較で  $P$  値が 0.0047 となり、これらの部位間でスポット性の程度が有意に異なることが示された。これらの傾向は回折像の観察時より示唆されており、当解析手法によりスポット性の程度を定量的に評価できることが示された。

一方で、相関係数による解析結果については、統計学的に有意な部位差は認められなかった。図 16a と 16b の対応関係を見ると、両解析手法においておおそ負の相関があるようなデータが得られているが、これら両解析手法では別の事象を評価している可能性がある。特に方位角方向の強度プロファイル中に多数のピークが存在するような場合には、相関係数、出現頻度ともに高くなることが考えられ、このような場合には両解析手法において、負の相関性は得られない。今回の結果から、腕や頬よりも額で特に負に相関していることがわかり、すなわち、額に比べて腕や頬では回折像のスポットの数そのものが多くなっている可能性が示唆された。

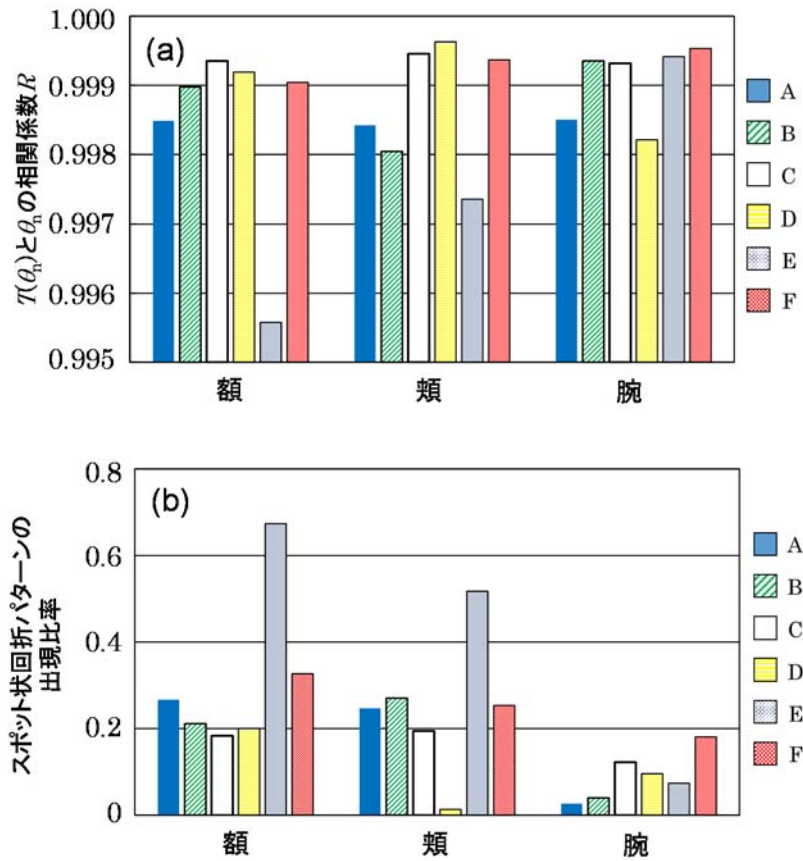


図 16 スポット状の回折像の出現頻度（個人差、部位差）

6名の被験者（A～F）の、額、頬、腕より取得した角層の回折パターンのスポット性の程度を2つの手法で定量的に評価した。(a) 方位角方向の回折強度分布を積算し、 $T(\theta_n)$ と $\theta_n$ の相関係数を計算することで、回折パターンのスポット性の程度について評価した。(b) 回折像がリング状かスポット状かを適当な閾値を設定して判定し（ $10^\circ$  以内の角度範囲内において、そのベースライン強度から 30 %以上高い強度値を示す点があるかどうかを判定した）、スポット状の回折像の出現頻度を評価した。

図 14 における被験者 F の 1 枚目の回折像は、全体的にコントラストが低く白っぽい像として観察されている。このような低コントラストの回折像は時折観察されることがあり、次に我々は、回折像の強度のコントラストに着目した解析を実施した。まず、目視で回折像を確認したところ、低コントラストの回折像は腕よりも額や頬において頻繁に観察されることがわかり、特に被験者 E においてその出現頻度が異常に高くなっていることがわかった。このような回折像のコントラストの変化には、ベースラインの強度に変化が伴っていることが予測され、そこで 1 次元化プロファイルのベースラインの強度値の減衰の様子を評価することで、回折像の見え方の違いを定量化することを試みた。具体的には、1 次元化プロファイルにおける小角側のダイレクトビーム付近 ( $s < 1.0 \text{ nm}^{-1}$ ) と脂質及びケラチンの散乱ピーク付近 ( $1.5 \text{ nm}^{-1} < s < 3.0 \text{ nm}^{-1}$ ) を除く領域に、(1) 式のベースライン関数  $I(s) = a \cdot s^{-n} + b$  をフィッティングし (Simplex 法による)、得られた  $n$  の値について、各個人及び部位間で比較した。図 17a, b では、腕及び額から得られた代表的な回折像とその 1 次元化プロファイル、1 次元化プロファイルのベースラインを赤点線で示し、さらに、そのフィッティング関数の指数  $n$  について各個人や部位でまとめた結果を c に示した。これらのデータは、各個人のそれぞれの部位について、100~120 個の 1 次元化プロファイルのフィッティング結果の平均値より構成される。

図 17c より明らかなように、個人間での値のバラつきがあるものの、全ての被験者においてベースラインパラメータ  $n$  の値 (絶対値) が、額、頬、腕の順に大きくなることがわかった。このような系統的な一連のデータは、ベースラインパラメータ  $n$  を抽出することにより、部位間だけでなく個人間での構造特性の違いを明らかにできる可能性を示唆している。特に、被験者 E では、全ての部位でその値が極端に小さくなることがわかり、特異な構造特性を持つ角層の定量評価に使用できる可能性を示唆している。また、これらの結果について部位間で  $t$  検定を実施したところ、額と腕の比較において  $P$  値が 0.001 以下、頬と腕の両方の比較において  $P$  値が 0.004 となり、ベースラインパラメータ  $n$  がそれぞれの部位間で有意に異なることが明らかとなった。これらの結果より、今回確立した 1 次元化プロファイルのベースラインの解析手法により、角質細胞の回折像の強度の減衰特性を定量的に解析することで、角質細胞の構造特性を評価できる可能性が見出された。

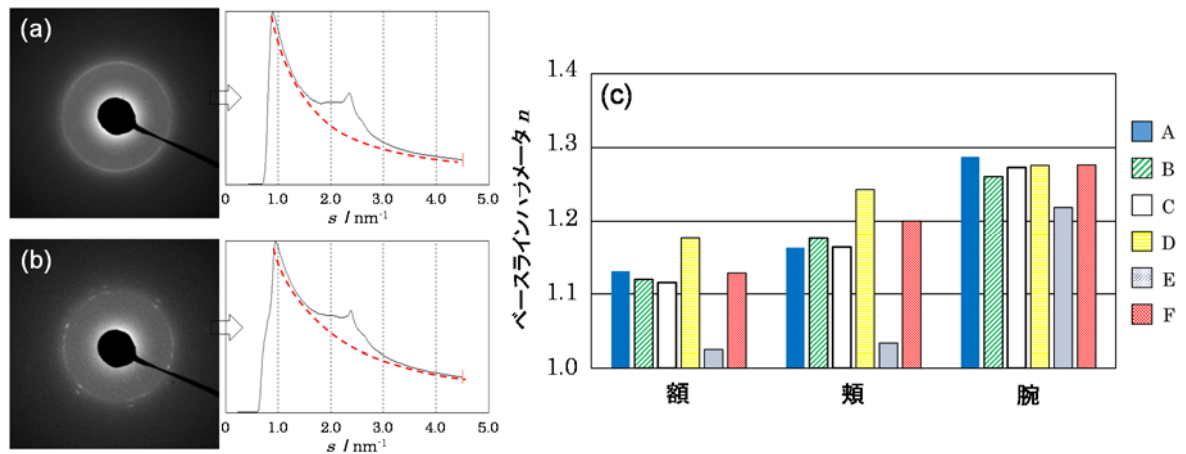


図 17 ベースラインパラメータ  $n$  による回折像の強度のコントラスト差の解析  
(個人差、部位差)

(a, b) 腕 (a) 及び頬 (b) より採取された角質細胞の代表的な回折像とその 1 次元化プロファイルを示した。またそれらの 1 次元化プロファイルのベースラインをプロファイル内に赤点線で示した。このベースラインは  $s = 1.0 \sim 4.5 \text{ nm}^{-1}$  (細胞間脂質やケラチン由来の反射が観測される  $s = 1.5 \sim 3.0 \text{ nm}^{-1}$  の範囲を除く) の範囲内にモデル関数  $I(s) = a \cdot s^{-n} + b$  をフィッティングすることで抽出されたものである。(c) フィッティングの結果得られた各個人のベースライン関数のパラメータ  $n$  の値 (100~120 個のデータの平均値) を部位ごとに示した。

最後に、電子線回折で得られた角質細胞の各構造パラメータと TEWL の値について、その両者の相関解析を実施した。角質細胞の採取時に測定した TEWL の平均値(5 回の測定)と、Pk27/Pk24、スポット率及びベースラインパラメータ  $n$  の各構造パラメータとの相関性について、図 18 でまとめた。

まず、TEWL の値そのものは部位間で有意に異なり、腕に比べて額、頬で高くなる傾向が認められた(図 18a)。また 6 名中 5 名において、頬よりも額の TEWL 値が高くなっており、TEWL の値は額、頬、腕の順に高くなっていることが示唆された。額において高い TEWL 値を計測した被験者 E、F については、その他の部位でも高い TEWL 値が計測されており、人による TEWL 値の違いの傾向も明らかとなった。

次に、TEWL と角層の各構造パラメータの相関性を解析するために、横軸を TEWL 値に、縦軸を Pk24 に対する Pk27 の強度(Pk27/Pk24; すなわち Ort 構造の存在量に相当)(図 18b)、スポットパターンの出現率(図 18c)、ベースラインパラメータ  $n$ (図 18d)とした図をそれぞれ示した。これらのデータは、各個人の 5 回の測定(それぞれの測定における構造パラメータの測定結果は 20~24 個のデータの平均値より構成)時の結果についてまとめられており、従って各部位のデータは 30 個(5 回×6 名)のデータ点より構成される。

これらの結果に基づき部位ごとの特徴をまとめると、腕では TEWL 値が低く、Ort 構造が多く、スポット率が低く、ベースラインパラメータ  $n$  の値が大きい傾向があり、額や頬では全く逆の傾向を示すことがわかった。さらにこれらの TEWL 値と角層の各構造パラメータとの相関性について詳細に解析するため、TEWL 値と各構造パラメータの相関係数  $R$  を見積もったところ、Pk27/Pk24 とベースラインパラメータ  $n$  に、比較的高い負の相関性が認められることがわかった(それぞれ、相関係数は  $R = -0.438$ 、 $R = -0.422$ )(図 18 b 及び d 内に表示)。スポット状回折パターンの出現率については、個人や測定ごとのバラつきが大きく、TEWL 値との相関性は確認されなかった( $R = 0.221$ )。



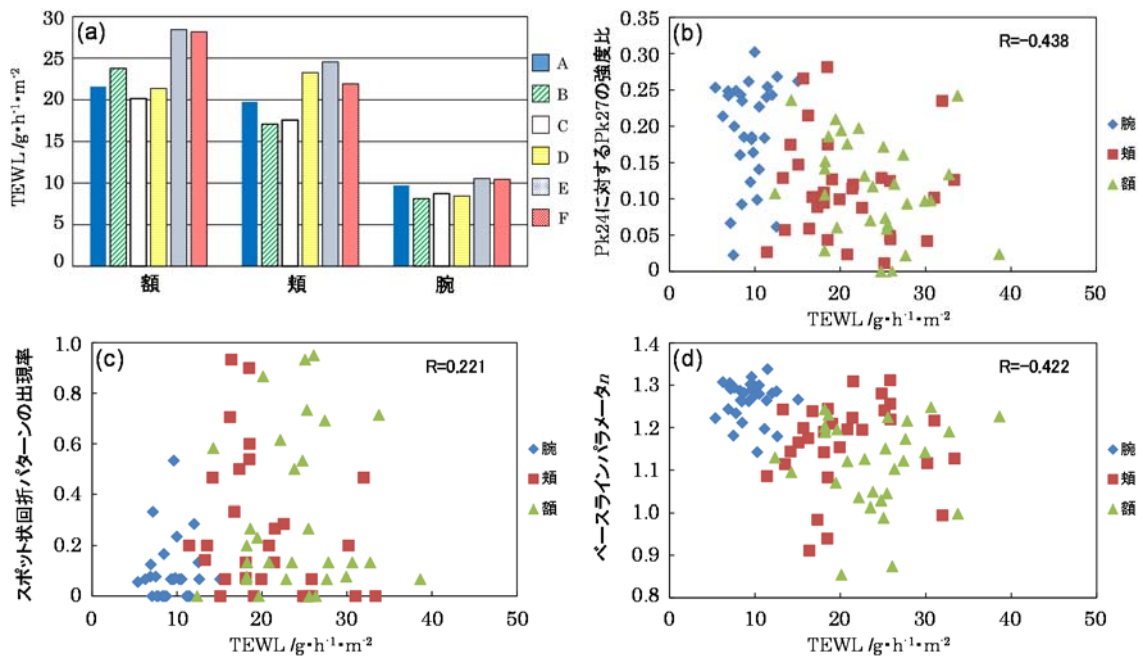


図 18 TEWL の値と角質細胞の各構造パラメータとの相関解析

(a) TEWL の値について 6 名の被験者のそれぞれの部位における平均値を示した。(b, c, d) 電子線回折より得られた角質細胞の各構造パラメータの値 (順に Pk27/Pk24、スポット率、ベースライン関数のパラメータ  $n$ ) と、その角質細胞を採取した際に測定した TEWL の値との相関性について示した。各図の TEWL の値は (a) の TEWL の値と一致している。また b, c, d の図中には相関係数 ( $R$ ) の値が示されている。

### 3.2 X 線回折法によるヒト皮膚角層の構造と含有水分及び TEWL との関係解析

#### 3.2.1 角層の含有水分量と細胞間脂質構造の相関性について

電子線回折とは異なり、X 線回折では容易に角層の小角散乱像が得られ、角層細胞間脂質のラメラ構造に関する情報を取得することが出来る(原理的には電子線回折においても角層の小角散乱実験は実施可能であるが、細胞間脂質のラメラ構造の情報を取得できたという報告例はない)。次に我々は、X 線回折法を用いたヒト角層のラメラ構造の解析実験を展開した。以前、太田らは含有水分量の異なるヘアレスマウスの角層を用いて X 線小角散乱実験を実施し、ラメラ構造の内部に水分が取り込まれ、含有水分量に応じてラメラ周期が増大することを見出している[29]。さらに太田らは、ほぼ等量存在する LPP と SPP の 2 種類のラメラ構造のうち、水と親和性の高い SPP だけがその内部に水を取り込み、ラメラ構造を膨潤させることを明らかにしている。ヘアレスマウスと異なり、ヒト角層のラメラ構造はほぼ SPP だけで構成されており、より顕著にこれらの構造変化が現れることが期待される。そこで、様々な水分量に調整したヒト角層を用いて、放射光によるそれらの X 線小角散乱実験を実施し、構造変化の様子を解析した。

5、10、15、20、25、30、40、50 wt %の各含有水分量に調整したヒト皮膚角層を、カプトンフィルムで完全に密封し、そこに X 線を照射して散乱像を取得した。それらの1次元化プロファイルを図 19a に示す。まず、これらのプロファイルの概形については、おおよそ Bouwstra らのヒト角層の実験結果と一致しており[21]、 $s=0.16 \text{ nm}^{-1}$  付近にブロードなピークが観察された。また高次反射の様子から、このブロードなピークは、おおよそ 6 nm のラメラ周期を持つ SPP に由来するものであると推測された。高次反射としては、 $s=0.22 \text{ nm}^{-1}$  付近と  $s=0.296 \text{ nm}^{-1} \sim s=0.315 \text{ nm}^{-1}$  付近に小さなピークが観察され、これらは SPP の 2 次反射、コレステロール、或いはわずかに存在する LPP ラメラの 3 次反射と考えられた。また図 19a では、それぞれの含有水分量の小角 1 次元化プロファイルを、水分量が少ない方から順に下から上と強度値の補正をせずにそのまま重ね書きして表示した。この図より、含有水分量に応じて  $s=0.16 \text{ nm}^{-1}$  付近の SPP ラメラ構造由来の散乱ピークの強度が大きく変化することがわかり、角層内に存在する水分子が角層のラメラ構造が大きく変化させることがわかった。これらのピークにガウス関数をフィッティングし、その形態変化を詳細に解析したところ、ピーク位置に関しては含有水分量が増えるとともに広角側にシフトし、そのシフトはおおよそ健康皮膚角層の水分量である 25 wt%付近で飽和することが分かった(図 19b)。また同様にピークの半値幅(図 19c)及びピーク強度(図 19d)についても含有水分の量に応じて変化し、その変化はおおよそ 25 wt%付近において極値を持つような変化を示すことが分かった。

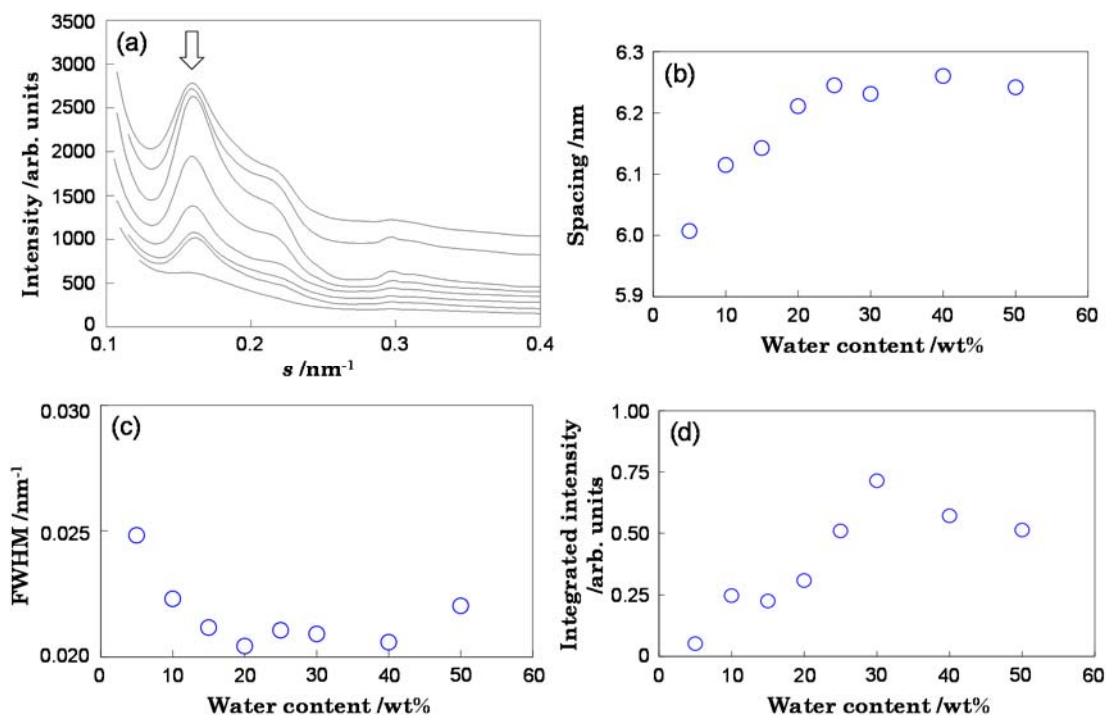


図 19 様々な水分量に調整したヒト皮膚角層の小角散乱プロファイルとその解析結果

(a) 下から 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 wt % に調整したヒト皮膚角層の小角散乱プロファイルを順に並べて表示した。白抜き矢印で示したのが SPP ラメラ構造由来の散乱ピークである。(b-d) 各水分量の SPP ラメラ構造由来のピークにガウス関数をフィッティングし、それらのピーク位置、半値幅、ピーク面積を解析した結果をそれぞれ示した。これらの図より、SPP ラメラ構造は、おおよそ 20~30wt% の水分量で飽和もしくは極値を持つことがわかった。

また、同様の試料において、角質細胞内に存在するソフトケラチンの  $s=1.0 \text{ nm}^{-1}$  付近に現れる構造由来散乱ピークの挙動についても解析を実施した。図 20a に、ケラチン由来ピークが含まれる中角領域の X 線散乱プロファイルを、また図 20b-d にそれらのガウス関数によるフィッティング結果を示した。図 20a より、ケラチンに関しても細胞間脂質のラメラ構造と同様、含有水分量の違いによって 1 次元化プロファイルの形状に大きな変化が生じることがわかった。またそれらのピークトップの位置は、含有水分量が多くなると膨潤することもわかった。このケラチンの膨潤の振る舞いについては、Heyらの角層肥厚での実験結果とおおよそ一致していた [66]。さらに半値幅、強度についてもラメラ構造と同様、おおよそ 20~30 wt% の水分量において飽和もしくは極値を持つことが分かった。細胞間脂質、ケラチンともに、健全な皮膚角層の水分量である 25 wt% 付近を極値とする構造変化が確認されたことは、生物学的に大変興味深い。

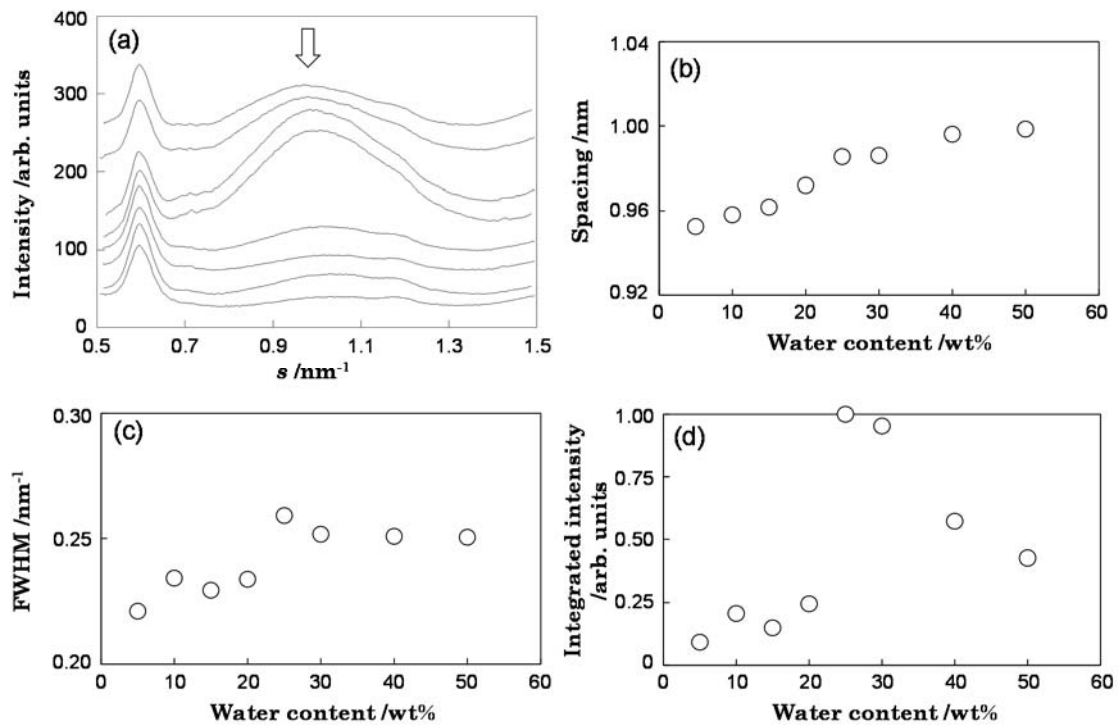


図 20 様々な水分量に調整したヒト皮膚角層の中角散乱プロファイルとその解析結果

(a) 下から 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 wt % に調整したヒト皮膚角層の中角散乱プロファイルを順に並べて表示した。 $s \approx 0.6 \text{ nm}^{-1}$  付近の鋭いピークは、窓材のカプトンフィルムによるものである。白抜き矢印で示したのがケラチン構造由来の散乱ピークである。

(b-c) 各水分量のケラチン構造由来のピークにガウス関数をフィッティングし、それらのピーク位置、半値幅、ピーク面積を解析した結果をそれぞれ示した。これらの図より、ケラチン構造の変化についても、SPP ラメラ構造同様、おおよそ 20~30wt% の水分量で飽和もしくは極値を持つような変化を示すことがわかった。

### 3.2.2 X線回折法による外部環境 2 分セルを用いたヒト皮膚角層の構造と TEWL 同時解析

次に我々は、角層裏面の下部が水の供給源と接し、表面側が乾燥状態にある、より *in vivo* の状態に近い環境下での X 線回折実験を検討した。*in vivo* の状態同様、このような環境では角層中の水分子は絶えず入れ替わっており、動的な水の動きと角層構造の関係を解析することが出来る。最近の放射光技術の発達により、特に我々が参加する SPring-8 03XU のビームラインは高輝度な X 線が得られるため、シート状の角層 1 枚でも有効な X 線回折像が得られるようになり、角層の表裏の環境を制御した実験展開が可能となった。また前で述べたように、角層の構造には個体差や部位差があり、当然ながらその温度変化や物性についても、個体による差が存在する。よって、構造と TEWL の相関性を精度よく解析するには、その両方を同時に測定し、相関解析を実施することが望ましい。そこで、シート状の角層を入射 X 線に対して斜めに設置し、角層下部の裏面を多量の水が入った水槽と接触させ、表面側には角層から蒸散する水分量を測定する TEWL 装置を設置した。このような試料の保持装置、すなわち“外部環境 2 分セル”を今回新たに開発し、これを用いて試料の温度を変化させて、X 線による角層の構造解析と TEWL の同時測定を実施した。

試料セルに角層シート 1 枚を設置し、そこに X 線を照射して回折像を取得しつつ、同時に TEWL の温度依存性を解析する実験を実施した。この実験では、元来の角層の外表面側が上面 (TEWL 測定側) に、体内側が下面 (水槽側) になるように、外部環境 2 分セル内に角層を設置した。温度を 20℃ から 70℃ まで上昇させて連続的に TEWL 値と X 線散乱像を取得したところ、X 線散乱像及び TEWL の両方が複雑に非連続的に変化することがわかった (図 21)。まず、X 線散乱像においては、細胞間脂質の相転移に伴う Ort 構造の消失や Hex 構造のピークシフトなどの変化が観察された。これらの相転移温度やその挙動の様子は、密封された角層試料で観察されている結果とおおよそ一致していた [21][36][61]。今回取得した X 線広角散乱プロファイル及び TEWL 値の温度依存性の解析結果を図 21 で示したが、20℃ から温度が上昇するにつれて、Pk24 のピーク強度が徐々に低下していき、おおよそ 42℃ でその変化は一旦収束し、さらに温度を上昇させると、今度は逆にピーク強度が大きくなっていくことがわかった。さらにこの時の Pk24 のピーク位置の変化は、最初は徐々にピーク位置を小角側 (格子間隔が膨らむ方向) にシフトさせるが、35℃ 付近でその変化は収束し、一旦広角側にシフトして、48℃ 付近で再び小角側へのシフトに転ずることがわかった。興味深いことに、同時に測定した TEWL 値の温度変化曲線は、Ort 構造が消失して Pk24 の強度が低下し始める 35℃ 付近で上昇し始め、Pk24 が広角側にシフトする中間段階であり Pk24 の強度が上昇し始める 42℃ 付近に肩を持ち、それ以上温度を上げると再び緩やかに上昇することがわかった。これらの変化の挙動は試料によっても若干異なるが、今回用いた試料においては、Ort 構造が消失すると TEWL 値は急激に上昇し始め、その変化は Pk24 の強度が増加する温度付近で停止することがわかった。

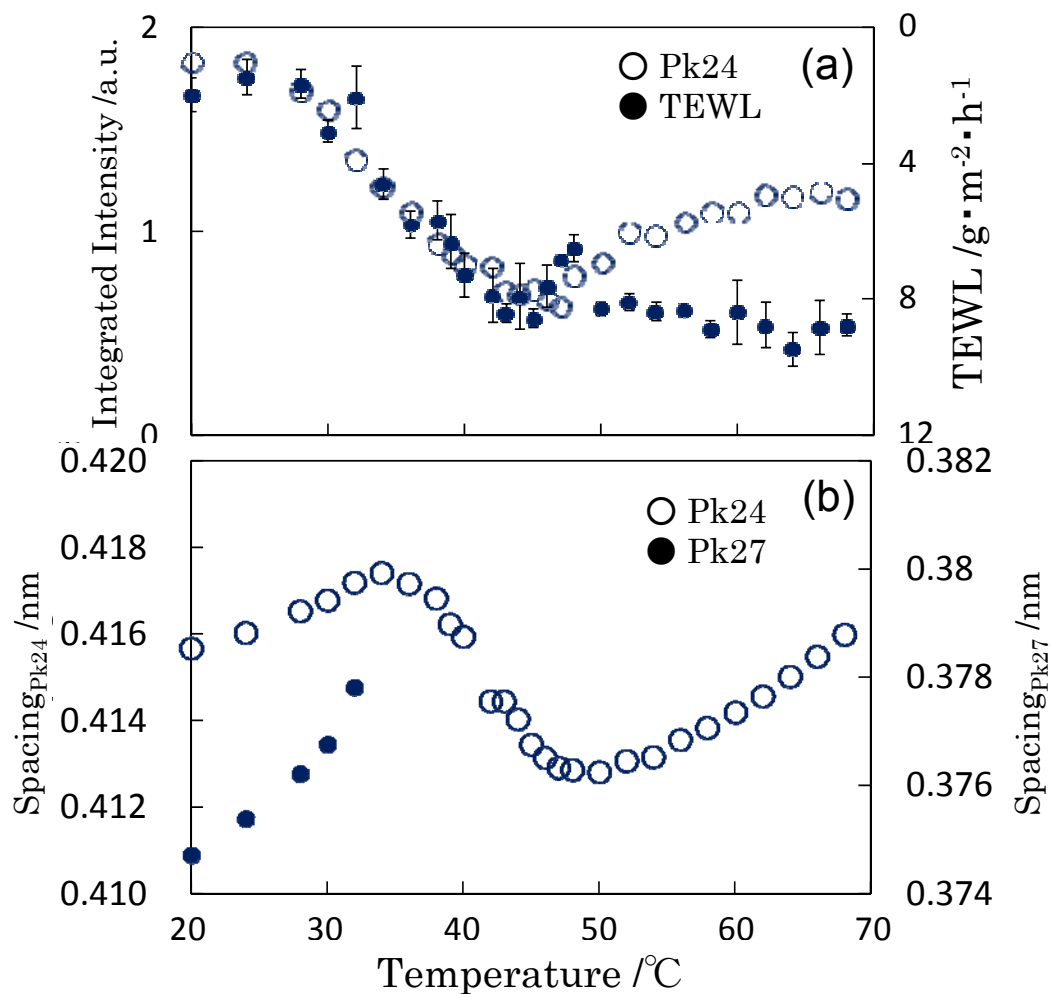


図 21 外部環境 2 分セルによる角層の X 線広角回折と TEWL の同時温度変化測定

水槽上に角層を設置し、温度を上昇させつつ (20~70°C)、同時に X 線回折像と TEWL 値を測定した結果を示した。(a) X 線回折実験より得られた Pk24 (○) のピーク位置の変化と TEWL 値 (●) の温度変化を示した。温度の上昇とともにピーク強度が低下し、その変化は 42°C 付近で停止することが確認できる。興味深いことに、同時に測定した TEWL 値は 42°C 付近に肩を持つことがわかった。(b) Pk24 (○) と Pk27 (●) それぞれのピークのピーク位置の温度変化の様子を示した。温度上昇の過程で、Pk24 は一旦広角側へシフトする。

## 4. 考察

### 4.1 電子線のビームダメージが角層構造に与える影響について

Pilgram らが導入した角層の電子線回折法は、非侵襲的に角層の構造解析を実施することができる非常に画期的な分析手法であった[32][37][61]。これにより、角層の様々な深さの層から角質細胞を採取し、角化の過程に伴う構造変化を解析するなどの実験が幅広く展開できるようになった[38][37]。しかしながら、彼らは試料を極低温にして電子線のビームダメージを回避する方法を取ったため、当手法の汎用性を大幅に低下させてしまい、さらに試料調製法が難しいという角層の電子線回折特有の手技上の困難さも手伝って、当手法を用いた研究が世の中で広く展開されることはなかった(実際に Pilgram らが 1998 年に初めて角層の電子線回折法を発表し[32]、2008 年に我々が当手法を更新した成果[38]を発表するまでの間、当手法に関する論文は全く発表されておらず、角層の電子線回折を実用化できたのは、世界でライデン大学と我々の 2 グループのみであった。)。そこで我々は、電子線回折法の汎用性を拡張するためには室温下での実験の実施が不可欠と判断し、常温下での角層の電子線回折実験の可能性について検討した。その結果、高感度検出器やビームシャッターを導入し、手技的に様々な工夫を凝らすことで、電子線の照射量を現状よりも大幅に低下できることを見出した。またこのような条件下で実験を実施すると、角層構造に対するビームダメージの影響をほぼ無視できることがわかり(図 13)、室温下における角層の電子線回折実験が実現可能であることが示された。このように非侵襲実験が展開できる電子線回折法の汎用性を大幅に高めたことは、大変意義深いことである。

図 13 に示されるように、角層に電子線を照射すると、まず Pk27 が小角側へとシフトしつつそのピーク強度を減衰させ、さらに電子線を照射し続けると、今度は Pk24 が小角側へとシフトしそのピーク強度を減衰させる。このような 2 段階の変化は、Ort と Hex でビームダメージに対する耐性が異なるために生じると推測される。ところで、ヒト角層の温度を室温付近から上昇させた際にも、これと似たようなピーク変化の挙動が観察される。角層の温度上昇過程においては、まず Pk27 の小角側へのシフトと減衰が生じ、さらに温度を上昇させると Pk24 に変化が生じることが知られており[36][65]、よって、電子線を照射した際にも局所的に温度が上昇している可能性が考えられる。しかしながら、温度の上昇過程においては Pk24 の強度が一旦減衰し、その後大きくなる変化が観察されるが(図 21 参照)、ビームダメージの過程においてはそのような変化は見られず、ピーク強度は電子線の照射量に応じて一様に減衰する。また、温度変化過程と異なり、ビームダメージ過程では回折像は不可逆的に変化することもわかっている。今回の検討により、電子線のビームダメージによる構造変化は、温度変化と似て非なる振る舞いを示すことも明らかとなった。

### 4.2 電子線回折法によるヒト角層構造の部位差と TEWL との相関解析について

今回、数多くの角質細胞の電子線回折像を取得することで、角質細胞は多様で細胞によって構造が異なり、不均一な構造を形成していることが分かった(図 14)。このような細胞レベルの局所的な構造解析は、電子線回折法でのみ可能となる。本研究の電子線回折実験では、平均構造を観察するため電子線の照射領域を  $55 \mu\text{m}^2$  に設定したが、さらに穴径の小さい制限視野絞りをを用いることで、さらに限られた局所領域( $1 \mu\text{m}^2$  程度)の構造解析も実施することが出来る。以前、我々が小さい制限視野絞りをを用いて予備的に細胞間脂質のドメイン構造の解析実験を実施したところ、そのドメインサイズはおおよそ数  $\mu\text{m}^2$  以下であることが示唆されている。今後の電子線回折実験の発展により、細胞間脂質のドメイン構造のマッピングなども可能になると思われる。

電子線回折法では非侵襲的な実験展開が可能であるので、多数のヒトから多数の試料を採集して多くの回折像を取得し、その平均値から個体差や部位差を解析するような実験を実施す

ることができる。今回の 6 名の被験者での検討により、個人差はあるものの平均値で見ると腕と比べて額や頬では Ort 構造の数及び量が低下しており、部位による細胞間脂質の側方配列構造の違いを明らかにすることに成功した。ここで、Pk24 には Hex 構造の 3 つと Ort 構造の 2 つの格子間隔に関する回折が、Pk27 には Ort 構造の 1 つの格子間隔に関する回折が含まれる(図 4c 参照)。よってこれらのピークが精度よく定量化でき、また全ての方向の回折強度が等価であると仮定すると、Ort 構造と Hex 構造の存在量の比は以下の式より見積もることが出来る[35]。

$$\frac{Pk_{24}}{Pk_{27}} = \frac{Hex_{24} + Ort_{24}}{Ort_{27}} = 3 \frac{Hex}{Ort} + 2 \quad \dots(5)$$

$$\therefore \frac{Hex}{Ort} = \frac{1}{3} \left( \frac{Pk_{24}}{Pk_{27}} - 2 \right) \quad \dots(6)$$

(6) 式を用いて額及び腕における Ort の存在量を見積もると、その値はおおよそ 20%と 50% 程度であった。一方で Ort パターンの出現率では、額で 40%、腕で 70%程度となっており、Ort パターンの出現率の値が若干高くなっていることがわかった。個体差や部位差があり、統一的には言えないが、今回取得した X 線回折のデータの Ort の存在率を見積もると、その値はおおよそ 60~70%であった。従って、上述のように電子線回折ではベースラインの設定が難しく、またピーク幅が大きいので、それぞれのピーク分離が難しく、よって Pk27 を小さく見積もっていた可能性が示唆された。

今回、量的解析(Pk27/Pk24)と数的解析(Ort 率)がほぼ同じ傾向を示していたことから、当実験で用いた電子線の照射面積(55 $\mu\text{m}^2$ )においては、Ort 構造が存在する角質細胞には、ほぼ一定の割合で Ort 構造が存在していることが示唆され、おおよそ角質細胞の平均構造を観察できていたことがわかった。またこれらの結果は、細胞間脂質のドメインサイズは、電子線の照射面積である 55  $\mu\text{m}^2$  よりも十分小さいということを示唆しており、以前の我々の実験結果と一致していた。一般に Ort 構造は、他の側方配列構造と比べて分子密度が最も大きいことから、最もバリア性能が高い側方配列と考えられている[37][45]。これらの見解には様々な意見があるが[67]、健康なヒト角層で存在率が高く、アトピーや魚鱗癬などの病変皮膚で存在率が低下していることがわかっており[37]、額や頬などの顔面部位では、腕に比べてバリア機能の低い細胞間脂質構造が形成されているのかもしれない(この内容については以下の TEWL との相関解析の項で記述する)。

次に、今回新たな指標として導入したスポット状回折像の出現率においても、部位による有意な違いが認められた。このスポット状の回折像が出現する理由としては、まず、細胞間脂質の側方配列の方向がきれいに整っていて、そのドメインサイズが電子線照射領域に比べて十分大きいような場合が挙げられるが、上記のような理由からこのようなケースはあまりないと考えられる。また別の見方としては、角質細胞の膜表面がうねっており、ブラッグの回折条件を満たす領域が少なくなり、結果的に回折がスポット状に見えることも考えられる。この場合、全体の反射強度が低下していることが推測されるが、本測定ではそのような回折強度の低下は確認されなかった。さらに、流動相がベースになっている、或いは脂質分子自体があまり存在しておらず、正常な側方配列構造が形成されていない細胞間脂質層において、結晶状態の脂質分子の塊が存在しているような場合にも、スポット状の回折像が出現することが予測される。興味深いことに、腕に比べて額や頬などの顔面部では皮脂の分泌量が多くなっており、これらが細胞間脂質層に陥入すると、細胞間脂質の側方配列構造を乱すとする報告例がある[32][68]。今回は 3 回のテープストリッピングを実施した後に角質細胞を採集したが、それらの層においても皮脂の影響が表れていたのかもしれない。また顔面部は腕と異なり、絶えず外気(乾燥空気や活性酸素、排ガスなどの環境刺激物質を含む空気)や紫外線などにさらされている。これらの影響から



細胞間脂質の側方配列構造が流動化し、その中の所々に小さな結晶様のドメインが存在することで、スポット状の回折像の出現頻度が高くなっていたのかもしれない。今回導入した 2 種類のスポット性の程度の解析法(相関係数と出現頻度解析法)において、異なる結果が得られたことは大変興味深い。両手法の解析結果の部位間における傾向はおおよそ一致していたが、両解析結果の相関係数はあまり高くなかった。これはスポット状の回折パターンに存在するスポットの数は、数個ではなく多数個存在していることを示唆しており(図 9b)、すなわち前述のように細胞間脂質が所々で多数の微結晶状態で存在していると考えたと辻褄があう。今回、方法の異なる 2 種類の解析手法でスポット性を評価したことで、ドメイン構造に関する貴重な情報が得られた。その他の可能性についても検討の余地が残るが、いずれにせよ、このような細胞間脂質の配列構造では、角層のバリア機能は大幅に低下していることが容易に想像され、これらの指標と TEWL との関係性については大変興味深い。今回独自に導入したスポット解析が、新たな皮膚バリア機能評価のための一つの指標になるかもしれない。

電子線回折像の 1 次元化プロファイルのベースラインパラメータ  $n$  は、腕で大きく頬や額では小さい値となっていた( $n_{\text{頬}} > n_{\text{額}}$ )。この  $n$  の値は、回折像の見た目のコントラストと直接的に関係していると思われる。すなわち、この  $n$  の値(絶対値)が小さくなると回折像のコントラストが小さくなり、逆に値が大きくなるとコントラストが大きくなると考えられる。通常、このような低コントラストの回折像は、角質細胞が 2 個重なっている箇所に電子線を照射したときなど、電子線の透過量が絶対的に小さくなっている場合に観察される。今回の測定においては、角質細胞が複数枚重なっていないことを確認しており、従って頬や額の 1 個 1 個の角質細胞自体の電子線の透過率が低下していたことが考えられる。これに関する興味深い報告としては、Machado らの角質細胞の表面積測定の実験がある[55]。彼らは、様々な部位からテープストリッピング法で角質細胞を回収して、光学顕微鏡を用いてその表面積を計測することで、額や頬の角質細胞の表面積は腕のそれと比べて有意に小さくなっていることを発見している[55]。角質細胞は角化の過程で徐々に扁平状に変化し、徐々にその表面積を増していくが、表面積が小さい額や頬の角質細胞は腕と比べて厚くなっているのかもしれない。よって、ベースラインパラメータ  $n$  は角層の厚さの情報を捉えている可能性がある。通常は角質細胞の厚さは、TEM による超薄切片観察や凍結 SEM などの手法を用いて計測されるが、これらには複雑な試料処理が伴い、著者の知る限り今のところ角質細胞の厚さを簡便に計測する手法はない。今回新たに導入した電子線回折法によるベースラインパラメータ  $n$  の解析法は、角質細胞の厚さを容易に計測する有効な手段になる可能性があり、その他の皮膚パラメータとの相関解析などへの応用が期待される。

図 23 に電子線回折実験による各個人の角層構造の解析結果をまとめた。今回の実験結果は、角層構造の部位差だけでなく、個人差もはっきりと確認することが出来る(被験者 C や F は Ort 構造が低下傾向にあり、被験者 E の額や頬のスポット率は際立って高い、など)。実際我々の検討においても、アトピー性皮膚炎の症状を持つ被験者の角層構造は、他の被験者と大きく異なることなどが示唆されている。今のところ電子線回折法は、このような個人の細胞間脂質の配列特性を簡便に測定できる唯一の分析手法である。今後、電子線回折法は角質細胞の構造の基礎検討だけでなく、個人の肌状態を解析するというようなより汎用的な評価手法となりうるだろう。

	Ort率	スポット率	<i>n</i>						
額 頬 腕	0.429	0.267	1.131	0.600	0.211	1.120	0.452	0.183	1.116
	0.281	0.247	1.163	0.418	0.271	1.176	0.392	0.195	1.164
	0.713	0.027	1.288	0.813	0.040	1.260	0.389	0.122	1.273
	A			B			C		
	0.275	0.200	1.176	0.502	0.673	1.025	0.201	0.327	1.128
	0.428	0.013	1.243	0.613	0.517	1.033	0.269	0.253	1.200
	0.799	0.095	1.276	0.808	0.074	1.219	0.661	0.181	1.276
	D			E			F		

図 23 各被験者の角質細胞の電子線回折構造パラメータの特徴解析

各被験者から採取した角質細胞の電子線回折構造パラメータ（Ort 率、スポット率、ベースラインパラメータ *n*）の一覧表を赤から青のグラデーションカラーマッピングで示した。Ort 率と *n* に関しては値が大きいほど青く、またスポット率に関しては値が大きいほど赤色に近づくように表示した。おおよそ腕で青く、額や頬で赤くなる傾向が認められるが、個人によって特徴的なパターンを示す。

最後に、今回、同時に測定した TEWL の値と、図 23 にまとめた電子線回折による各構造パラメータの値との関係性について考察する。図 18 にはそれらの関係性を示すデータが表示されているが、平均値で見ると、Ort 構造の存在量が少なく、またスポット状回折像の出現頻度が高く、さらにベースラインパラメータ *n* の値が小さい（おそらく角質細胞が厚い）額や頬では、腕に比べて TEWL の値が極端に高くなっている（図 16、図 17c、図 18a 参照）。この傾向をさらに詳細に解析するため、それぞれの被験者の個別の測定データを用いて、TEWL 値との相関解析を実施したところ、Ort の存在量とベースラインパラメータ *n* に TEWL との高い相関性が認められた（ $|R| > 0.4$ ）。一方でスポット率は、額、頬、腕の順に値が高く、TEWL と同様の傾向があり特にその相関性が示唆されたが、個別のデータで見ると両者の相関性は低かった。このスポット率に関しては、皮脂と関係性を指摘したが、一般に皮脂は水の移動に対してバリアになるとも考えられている[74]。TEWL に関しては、細胞間脂質以外にも様々な要素が複雑に絡んでいる可能性があり（たとえば皮脂や NMF、ケラチン、発汗など）、慎重に解析する必要がある。今回の電子線回折の成果により、角層のバリア機能を評価しうる様々な角質細胞の構造パラメータの導出方法が確立され、さらにこれらの結果より Ort 構造及びベースラインパラメータ *n* と TEWL が相関している可能性が示された。

#### 4.3 角層の含有水分量とラメラ構造の関係について

角層の水に対するバリア機能を評価するためには、角層内に含有される水分子そのものが、角層の構造にどのような影響を与えるのかを十分に把握しておく必要がある。今回我々が、様々な含有水分量に調整したヒト角層を用いて X 線回折実験を実施したところ、含有水分の量に応じて細胞間脂質 SPP ラメラ構造及び角質細胞内のケラチン構造が大きく変化することが分かった。この SPP ラメラ構造の変化は、マウス角層を用いた太田らの X 線回折実験や、Charalambopoulou らの中性子線回折による実験結果とほぼ一致しており、水分量に応じてラメラ構造が膨潤し、ラメラ間隔が長くなることがわかった[29][30]。細胞間脂質の主成分であるセラミド分子は疎水的性質が高く、それらが主成分となるラメラ構造には水分子は存在しないとする見解もあるが、今回の実験結果より、SPP のバイレイヤー間には水分子が存在しており、さらにその存在量は含有水分量に応じて変化することが明らかとなった。さらに今回の結果において、細胞間脂質ラメラとケラチンの両方の回折ピークが、正常ヒト角層の含有水分量である 25 wt%付近で最も強度が高く、また半値幅が小さくなっていたことは大変興味深い。これらの実験結果は、角層はリोटロピックに相転移し、その構造はおおよそ 25 wt%付近で最も秩序化され、安定して存在していることを示している。このリोटロピック相転移の水分量は、一般的なリン脂質膜などの相転移点ともおおよそ一致しており[69]、細胞間脂質と水は密接に相互作用して存在していることが示唆された。

Imokawa らは角層の DSC による分析において、角層内の水はおおよそ 22 wt%までは結合水として存在し、それ以上含まれると自由水となることを報告している[70]。さらに Suhonen らは、角層内に過剰に水が存在すると経皮吸収が促進されることを報告している[71]。これらの事象や今回得られた結果は、角層内に過剰な水が存在すると、細胞間脂質やケラチンの構造に乱れが生じ、バリア機能の低下につながることを示唆しているのかもしれない。一般的には、角層内の水はそのほとんどが角質細胞の内部に存在しており、細胞間脂質のバイレイヤー間にはわずかな量の水しか存在していないと考えられているが、含有水分の量が大きく異なるケラチンと細胞間脂質の両方の構造体が同様の水分量傾向を示していることは大変興味深い。細胞間脂質とケラチンが連動して、角層全体の構造を安定化するメカニズムが備わっているのかもしれない。

#### 4.4 X 線/TEWL 同時測定について

今回実施したヒト角層の X 線温度変化解析実験では、これまでの密封した角層試料での温度変化解析実験と同じような構造変化が観察された[21][36][61]。図 21 で示した昇温過程における細胞間脂質の側方配列の回折ピークの変化は次のようなものであった。まず、20℃から温度を上昇させると、Pk24 のピーク強度は徐々に低下していき、その変化は 42℃付近で一旦収束し、さらに温度を上昇させると今度は一転して上昇するというものであった。また、ピーク位置に関しては、Pk24、Pk27 とともに小角側へと徐々にシフトしつつ同時にその強度を弱め、35℃付近で Pk27 が消滅し、さらに温度を上昇させると Pk24 は一旦広角側へシフトし、48℃付近を境に再び小角側へのシフトに転ずる。通常、熱力学的な観点から、細胞間脂質の側方配列が温度上昇の過程において、よりタイトにパッキングされる方向に変化することは考えにくい。従って、35℃付近で Ort 構造が一旦消滅し、その後、周囲の Hex 構造と再編成して新たな Hex 構造(以下、HexH とする。)が出現したと考えると、熱力学的な矛盾は解消するようと思われる。崩壊した Ort 構造が Hex 構造の内部に取り込まれて、Hex 構造よりも若干格子定数の小さい 1 つもしくは複数の HexH 構造が誕生し、その結果、ピークが少し広角側にシフトしたように観察されたのかもしれない[36]。しかしながら、一般的には細胞間脂質の格子定数は、炭化水素鎖の鎖軸周りの回転運動の有無で規定されると考えられる[37][72]。すなわち、炭化水素鎖の垂直断面の形状が、回転していれば円、回転していなければ楕円となり、回転し

ている場合は等方的な Hex、回転していない場合は1方向のみ格子間隔が短くなった Ort を形成する(図 4c 参照)。従って、Ort 構造が Hex 構造にどのような形で組み込まれ、しかも通常よりも格子間隔の小さい Hex 構造がどのような状態で存在しているのかはよくわからないところである。温度変化過程で生じる細胞間脂質の相転移挙動については、今後さらに検討していく必要がある。細胞間脂質の相転移挙動についてはまだまだ検討の余地が残るが、今回の実験結果より、35℃付近で HexH 構造が出現し始め、そのピークの広角側へのシフトが停止する 48℃付近でこれらの再編成が終了してほぼ全層が HexH になっていることが示唆された。つまり、HexH 相出現に絡む再編成の起点が 35℃であり、終点が 48℃であると推測された。

これらの温度領域において、同時に測定した TEWL の温度曲線は、大変興味深い形状を示した。図 21 に TEWL そのものの値(実線)とその微分値(点線)を示したが、35℃付近から TEWL 値は上昇し、42℃付近に肩を持つような変化を示した。角層内の水の移動から TEWL を定義すると、(4)式は以下のように書き換えることができる[22][73]。

$$-D = \frac{1}{A} \frac{dm}{dt} \times \frac{SC}{\Delta C} \quad \cdots(7)$$

ここで、 $D$  は角層内における水の拡散係数、 $SC$  は角層の厚さ、 $\Delta C$  は角層内における水の濃度変化である。一般的に、拡散係数  $D$  は温度に依存し、一意的に上昇することが知られている( $D \propto \exp(-E/k_B T)$ )。しかしながら、今回得られた結果では、TEWL 値は温度上昇に伴って一意的に上昇せず、従って、これらの結果は、角層内の水の存在状態そのものが変化していることを示している。

X 線と TEWL、両方のプロファイルを対応させると、Ort 消滅及び HexH が出現し始める温度で TEWL 値が上昇し始め、HexH への相転移の中間段階(～42℃)で、TEWL 値が肩を持つことが分かった。通常、異なる脂質の相が同一系内に存在し、それらが共存する場合、それらの比率が 1:1 になる時にドメイン境界が最も多くなり、脂質膜間を通過する物質の透過性が最も高くなることが知られている。今回の実験結果は、Hex と Ort が再編成されて HexH が出現し始めた結果、ドメイン境界の数が多くなって TEWL 値が上昇し始め、また最もドメイン境界が多くなると考えられる HexH 再編の中間段階において、TEWL が極値を持ち、さらに温度が上昇して、ほぼ全体が HexH に変化すると、TEWL 値は一定に落ち着くということで説明できるのかもしれない。

今回の測定により、TEWL 値の温度変化曲線の変化は、細胞間脂質の相転移挙動でほぼ説明できることが示唆され、角層内の水の挙動に対する細胞間脂質の配列構造の寄与の可能性が初めて示された。角層構造の温度変化挙動に関しては、個体差もありまだまだ未解明な部分は残るが、今回開発した外部環境 2 分セルにより、角層内の水の移動や保持状態に細胞間脂質が寄与していることが世界で初めて実験的に直接示された。

## 5. 結論

本検討により、室温下におけるヒト皮膚角層の電子線回折実験が実施可能であることがわかり、これにより電子線回折法の汎用性を大幅に向上させることに成功し、個体差や部位差が大きいヒト皮膚角層においても統計学的な解析による実験展開が可能であることが示された。また当手法を用いて、ヒトの額、頬、腕より角質細胞を採取し、その構造を比較したところ、腕に比べて額や頬では有意に Ort 構造の存在比率が低下していることがわかり、角質細胞構造の部位差を明らかにすることに成功した。さらに同時に測定した TEWL の値と角質細胞の構造の相関性を解析したところ、Ort 構造が少ない角質細胞では TEWL が大きくなる傾向があり、両者の相関関係が示唆された。

X 線回折法により、様々な水分含有量に調整したヒト角層の構造解析を実施したところ、およそ 25 wt% 付近を極値とするリオトロピックな構造変化が確認された。この水分量は健常なヒト皮膚における角層水分量とおおよそ一致しており、角層の構造形成に対して水分子の存在量が影響していることが示唆された。また今回、入射 X 線に対してシート状の角層試料を 45° 程度傾けて設置する外部環境 2 分セルを開発することに成功し、このセルを用いることで、角層試料の X 線による構造解析と TEWL の同時測定が実現化された。今回、両者の同時温度変化解析を実施したところ、Ort 構造の相転移温度付近から TEWL が上昇し始め、その上昇は Ort と Hex の共存状態から HexH に相転移する中間温度付近で収束することがわかった。

これらの結果は、角層の構造、特に細胞間脂質と水分子が密接に関係しており、さらに角層内を移動する水分子は、細胞間脂質の相転移やドメイン構造の存在状態に影響を受けることを示している。これらの結果より、今回開発した角層構造の新しい分析手法の有効性が確認され、さらに角層と水に関する様々な新しい知見を得ることに成功した。今後、これらの分析手法を水以外の様々な物質に適用することで、より浸透性の高い経皮吸収型製剤の開発研究に応用していくことを目指す。

[参考文献]

- [1] Elias PM (1983) Epidermal lipids, barrier function, and desquamation, *J. Invest. Dermatol.* 80, 44-49.
- [2] P.M. Elias, D.S. Friend (1975) The permeability barrier in mammalian epidermis, *J. Cell Biol.*, 65, 180-191.
- [3] K. Hanley, U.P. Devaskar, S.J. Hicks, Y. Jiang, D. Crumrine, P.M. Elias, M.L. Williams, K.R. Feingold (1997) Hypothyroidism delays fetal stratum corneum development in mice, *Pediatr Res.* 42, 610-614.
- [4] Y. Mishima (1966) Melanosomes in phagocytic vacuoles in Langerhans cells. Electron microscopy of keratin-stripped human epidermis, *J Cell Biol.* 30(2), 417-423.
- [5] E.A. Lumpkin, T. Collisson, P. Parab, A. Omer-Abdalla, H. Haeberle, P. Chen, A. Doetzlhofer, P. White, A. Groves, N. Segil, J.E. Johnson (2003) Math1-driven GFP expression in the developing nervous system of transgenic mice. *Gene Expr Patterns.* 3, 389-395.
- [6] J.M. Brandner (2007) Pores in the epidermis: aquaporins and tight junctions, *Int J Cosmet Sci.* 29, 413-422.
- [7] M. Hara, T. Ma, A.S. Verkman (2002) Selectively reduced glycerol in skin of aquaporin-3-deficient mice may account for impaired skin hydration, elasticity, and barrier recovery, *J Biol Chem.*, 277, 46616-46621.
- [8] T. Yamamura, T. Tezuka (1989) The water-holding capacity of the stratum corneum measured by <sup>1</sup>H-NMR, *J Invest Dermatol.* 93, 160-164.
- [9] S. Sakai, R. Yasuda, T. Sayo, O. Ishikawa, S. Inoue (2000) Hyaluronan exists in the normal stratum corneum, *J Invest Dermatol.* 114, 1184-1187.
- [10] P.M. Elias, N.S. McNutt, D.S. Friend (1977) Membrane alterations during cornification of mammalian squamous epithelia: a freeze-fracture, tracer, and thin-section study, *Anat Rec.* 189, 577-594.
- [11] L. Norlén (2001) Skin Barrier Formation: The Membrane Folding Model, *J. Invest. Dermatol.* 117, 823-829.
- [12] R.P. Reinertson, V.R. Wheatley (1959) Studies on the chemical composition of human epidermal lipids, *J. Invest. Dermatol.* 32, 49-59.
- [13] A. Weerheim, M. Ponc (2001) Determination of stratum corneum lipid profile by tape stripping in combination with high-performance thin-layer chromatography, *Arch. Dermatol. Res.* 293, 191-199.
- [14] P.W. Wertz, D.T. Downing (1987) Covalently bound omega-hydroxyacylsphingosine in the stratum-corneum, *Biochim. Biophys. Acta.* 917, 108-111.
- [15] J.R. Hill, P.W. Wertz (2003) Molecular models of the intercellular lipid lamellae from epidermal stratum corneum, *Biochim Biophys Acta.* 1616, 121-126.
- [16] W. Abraham, D.T. Downing (1989) Preparation of model membranes for skin permeability studies using stratum corneum lipids, *J. Invest. Dermatol.* 93, 809-813.
- [17] H. Nakazawa, K. Fukunaga, S. Sakai, M. Yakumaru, Y. Sumida, S. Inoue (2005) Characteristics of  $\beta$ -Galactosyl-L-serine-diamides in reinforcing the SC lamellar structure. *J. Jpn. Cosmet. Sci. Soc.* 29, 103-109.
- [18] K.C. Madison, D.C. Swartzendruber (1987) Presence of intact intercellular lipid lamellar in the upper layers of the stratum corneum, *J. Invest. Dermatol.* 88, 714-718.
- [19] S.Y. Hou, A.K. Mitra, S.H. White, G.K. Menon, R. Ghadially, P.M. Elias (1991) Membrane structures in normal and essential fatty acid-deficient stratum corneum:

- characterization by ruthenium tetroxide staining and x-ray diffraction, *J. Invest. Dermatol.* 96, 215-223.
- [20] S.H. White, D. Mirejovsky, G.I. King (1988) Structure of lamellar lipid domains and corneocyte envelopes of murine stratum corneum. An X-ray diffraction study. *Biochemistry* 27, 3725-3732.
- [21] J.A. Bouwstra, G.S. Gooris, J. A. van der Spek, W. Bras (1991) Structural investigations of human stratum corneum by small-angle X-ray scattering. *J. Invest. Dermatol.* 97, 1005-1012.
- [22] H. Nakazawa, N. Ohta, I. Hatta (2012) A possible regulation mechanism of water content in human stratum corneum via intercellular lipid matrix, *Chem Phys Lipids*. 165, 238-243.
- [23] J. Cussin, G.S. Gooris, M. Janssens, J. A. Bouwstra (2008) Lipid organization in human and porcine stratum corneum differs widely, while lipid mixtures with porcine ceramides model human stratum corneum lipid organization very closely, *Biochim. Biophys. Acta*. 1778, 1472-1482.
- [24] N. Ohta, I. Hatta (2002) Interaction among molecules in mixtures of ceramide/stearic acid, ceramide/cholesterol and ceramide/stearic acid/cholesterol, *Chem. Phys. Lipids*. 115, 93-105.
- [25] J.A. Bouwstra, G.S. Gooris, F. E. R. Dubbelaar, M. Ponc (2002) Phase Behavior of Stratum Corneum Lipid Mixtures Based on Human Ceramides: The Role of Natural and Synthetic Ceramide 1. *J. Invest. Dermatol.* 118, 606-617.
- [26] M. Oguri, G. S. Gooris, K. Bito, J. A. Bouwstra (2014) The effect of the chain length distribution of free fatty acids on the mixing properties of stratum corneum model membranes, *Biochim. Biophys. Acta*. 1838, 1851-1861.
- [27] M. Ponc, S. Gibbs, G.S.K. Pilgram, E. Boelsma, H. Koerten, J.A. Bouwstra (2001) Barrier function in reconstructed epidermis and its resemblance to native human skin, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 14, 63-71.
- [28] J.A. Bouwstra, G.S. Gooris, F.E. Dubbelaar, A.M. Weerheim, A.P. Ijzerman, M. Ponc (1998) Role of ceramide1 in the molecular organization of the stratum corneum lipids, *J. Lipid Res.* 39, 186-196.
- [29] N. Ohta, S. Ban, H. Tanaka, S. Nakata, I. Hatta (2003) Swelling of intercellular lipid lamellar structure with short repeat distance in hairless mouse stratum corneum as studied by X-ray diffraction, *Chem. Phys. Lipids*. 123, 1-8.
- [30] G.C. Charalambopoulou, T.A. Steriotis, T. Hauss, A.K. Stubos, N.K. Kanellopoulos (2004) Structure alterations of fully hydrated human stratum corneum. *Physica B* 350, e603-606.
- [31] J.A. Bouwstra, G.S. Gooris, M.A. Salomonsdevries, J.A. Vanderspek, W. Bras (1992) Structure of human stratum corneum as a function of temperature and hydration a wide angle X-ray diffraction study, *Int. J. Pharm.* 84, 205-216.
- [32] G.S.K. Pilgram, A.M. Van Pelt, F. Spies, J.A. Bouwstra, H.K. Koerten (1998) Cryo-electron diffraction as a tool to study local variations in the lipid organization of human stratum corneum. *J Microsc.* 189, 71-78.
- [33] F. Damien, M. Boncheva (2010) The extent of orthorhombic lipid phases in the stratum corneum determines the barrier efficiency of human skin in vivo. *J. invest. Dermatol.* 130, 611-614.
- [34] H. Nakazawa, T. Imai, I. Hatta, S. Sakai, S. Inoue, S. Kato (2013) Low-flux

- electron diffraction study for the intercellular lipid organization on a human corneocyte. *Biochim Biophys Acta*. 1828, 1424-1431.
- [35] I. Hatta, H. Nakazawa, Y. Obata, N. Ohta, K. Inoue, N. Yagi (2010) Novel method to observe subtle structural modulation of stratum corneum on applying chemical agents, *Chem. Phys. Lipids* 163, 381-389.
- [36] I. Hatta, N. Ohta, K. Inoue, N. Yagi (2006) Coexistence of two domains in intercellular lipid matrix of stratum corneum, *Biochim. Biophys. Acta*. 1758, 1830-1836.
- [37] G.S.K. Pilgram, D.C.J. Vissers, H. van der Meulen, S. Pavel, S.P.M. Lavrijsen, J.A. Bouwstra, H.K. Koerten (2001) Aberrant lipid organization in stratum corneum of patients with atopic dermatitis and lamellar ichthyosis. *J. Invest. Dermatol.*, 117, 710-717.
- [38] H. Nakazawa, A. Yamagishi, T. Imai, Y. Ban, S. Sakai, S. Inoue, S. Kato (2008) Study on regional differences of stratum corneum structure in human skin by electron diffraction, *Chem. Phys. Lipids* 154, S27.
- [39] M. Janssens, A.A. Mulder, J. van Smeden, G.S.K. Pilgram, R. Wolterbeek, A.P. Lavrijsen, R.I. Koning, A.J Koster, J.A. Bouwstra (2013) Electron diffraction study of lipids in non-lesional stratum corneum of atopic eczema patients, *Biochim Biophys Acta*. 1828, 1814-18121.
- [40] H. Nakazawa, S. Sakai, S. Inoue, I. Hatta, S. Kato (2009) Electron diffraction study on regional difference in human skin stratum corneum structures, *Chem. Phys. Lipids* 160, S47-S48.
- [41] H. Nakazawa, A. Yamagishi, T. Imai, Y. Ban, S. Sakai, S. Inoue, S. Kato (2008) Study on regional differences of stratum corneum structure in human skin by electron diffraction, *Chem. Phys. Lipids* 154, S27.
- [42] T. Yuki, A. Komiya, A. Kusaka, T. Kuze, Y. Sugiyama, S. Inoue (2013) Impaired tight junctions obstruct stratum corneum formation by altering polar lipid and profilaggrin processing, *J Dermatol Sci*. 69, 148-158.
- [43] R. Ghadially, M.L. Williams, S.Y. Hou, P.M. Elias (1992) Membrane structural abnormalities in the stratum corneum of the autosomal recessive ichthyoses, *J. invest. Dermatol*. 99, 755-763.
- [44] G. Imokawa, A. Abe, K. Jin, Y. Higaki, M. Kawashima, A. Hidano (1991) Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin?, *J. Invest. Dermatol*. 96, 523-526.
- [45] F. Damien, M. Boncheva (2010) The extent of orthorhombic lipid phases in the stratum corneum determines the barrier efficiency of human skin in vivo. *J. invest. Dermatol*. 130, 611-614.
- [46] M. Denda, J. Koyama, R. Namba, I. Horii (1994) Stratum corneum lipid morphology and transepidermal water loss in normal skin and surfactant-induced scaly skin, *Arch Dermatol Res.*, 286, 41-46.
- [47] Y. Ohbata, I. Hatta, N. Ohta, N. Kunizawa, N. Yagi, K. Takayama (2006) Combined effects of ethanol and L-menthol on hairless rat stratum corneum investigated by synchrotron X-ray diffraction, *J. Control Release*, 115, 275-279.
- [48] Y. Obata, I. Hatta, N. Ohta, N. Kunizawa, N. Yagi, K. Takayama (2006) Combined effects of ethanol and l-menthol on hairless rat stratum corneum investigated by synchrotron X-ray diffraction, *J. Control. Release* 115, 275-279.
- [49] P.M. Elias, E.R. Cooper, A. Korc, B. Brown (1981) Percutaneous transport in



- relation to stratum corneum structure and lipid composition, *J. invest. Dermatol.* 76, 297-301.
- [50] H. R. Moghimi, A. C. Williams, B. W. Barry (1996) A lamellar matrix model for stratum corneum intercellular lipids III. Effects of terpene penetration enhancers on the release of 5-fluorouracil and oestradiol from the matrix, *Int. J. Pharm.* 145, 37-47.
- [51] B.A.I. van den Bergh, J. Vroom, H. Gerritsen, H.E. Junginger, J.A. Bouwstra (1999) Interactions of elastic and rigid vesicles with human skin in vitro: electron microscopy and two-photon excitation microscopy, *Biochim Biophys Acta.* 1461, 155-173.
- [52] J.L. L  v  que, P. Hall  got, J. Doucet, G. Pi  rard (2002) Structure and function of human stratum corneum under deformation, *Dermatology.* 205, 353-357.
- [53] G. Grubauer, P.M. Elias, K.R. Feingold (1989) Transepidermal water loss; the signal for recovery of barrier structure and function., *J Lipid Res* 30, 323-333.
- [54] J. Doucet, A. Potter, C. Baltenneck, Y. A. Domanov (2014) Micron-scale assessment of molecular lipid organization in human stratum corneum using microprobe X-ray diffraction, *J Lipid Res* 55, 2380-2388.
- [55] M. Machado, T.M. Salgado, J. Hadgraft, M.E. Lane (2010) The relationship between transepidermal water loss and skin permeation, *Int. J. pharm.* 384, 73-77.
- [56] P.J. Caspers, W.G. Lucassen, E.A. Carter, H.A. Bruining, G.J. Puppels (2001) *In vivo* confocal Raman microspectroscopy of the skin: non-invasive determination of molecular concentration profiles. *J. Invest. Dermatol.* 116, 434-442.
- [57] H. Tagami, H. Kobayashi, K. Kikuchi (2002) A portable device using a closed chamber system for measuring transepidermal water loss: comparison with the conventional method. *Skin Res Technol.* 8, 7-12.
- [58] D. K. Paepe, E. Houben, R. Adam, F. Wiesemann, V. Rogiers (2005) Validation of the VapoMeter, a closed unventilated chamber system to assess transepidermal water loss vs. the open chamber Tewameter. *Skin Res Technol.* 11(1), 61-69.
- [59] H. Masunaga, et al. (2011) Multipurpose soft-material SAXS/WAXS/GISAXS beamline at SPring-8, *Polymer journal* 43, 471-477.
- [60] K. Miura, M. Kawamoto, K. Inoue, M. Yamamoto, T. Kumasaka, M. Sugiura, A. Yamane, H. Moriyama (2000) Commissioning for wide-angle routine proteomix beamline BL40B2: protein crystallography and small angle scattering, *SPring-8 user Experiment Report* 4:168.
- [61] G.S.K. Pilgram, A.M. Engelsma-van pelt, J.A. Bouwstra, H.K. Koerten (1999) Electron diffraction provides new information on human stratum corneum lipid organization studied in relation to depth and temperature, *J. Invest. Dermatol.* 113, 403-409.
- [62] P. W. Wertz, D. T. Downing (1983) Acylglucosylceramides of pig epidermis: structure determination, *J Lipid Res* 24, 753-758.
- [63] A. Capt, A. P. Luzy, D. Esdaile, O. Blanck (2007) Comparison of the human skin grafted onto nude mouse model with *in vivo* and *in vitro* models in the prediction of percutaneous penetration of three lipophilic pesticides, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 47, 274-287.
- [64] J. Caussin, G. S. Gooris, M. Janssens, J. A. Bouwstra (2008) Lipid organization in human and porcine stratum corneum differs widely, while lipid mixtures with porcine ceramides model human stratum corneum lipid organization very closely, *Biochim. Biophys. Acta.* 1778, 1472-1482.

- [65] T. Imai, H. Nakazawa, S. Kato (2013) Thermal phase transition behavior of lipid layers on a single human corneocyte cell, *Chem. Phys. Lipids* 174, 24-31.
- [66] M. J. Hey, D. J. Taylor, W. Derbyshire (1978) Water sorption by human callus. *Biochim. Biophys. Acta* 540, 518–533.
- [67] D. Groen, D. S. Poole, G. S. Gooris, J. A. Bouwstra (2010) Is an orthorhombic lateral packing and a proper lamellar organization important for the skin barrier function?, *Biochim. Biophys. Acta*. 1808, 1529-1537.
- [68] D. T. Downing, J. S. Strauss (1982) On the mechanism of sebaceous secretion. *Arch Dermatol Res* 272, 343–349.
- [69] M. Kodama, M. Kuwabara, S. Seki (1982) Successive phase transition phenomena and phase diagram of the phosphatidylcholine-water system as revealed by differential scanning calorimetry, *Biochim. Biophys. Acta*. 689, 567-570.
- [70] G. Imokawa, H. Kuno, M. Kawai (1991) Stratum corneum lipids serve as a boundwater modulator. *J. Invest. Dermatol.* 96, 845–851.
- [71] T. M. Suhonen, J. A. Bouwstra, A. Urtti (1999) Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structure alterations, *J. Control. Rel.* 59, 149–161.
- [72] J. A. Bouwstra, M. Ponc (2006) The skin barrier in healthy and diseased state, *Biochim. Biophys. Acta*. 1758, 2080-2095.
- [73] S. Bielfeldt, V. Schoder, U. Ely, A. van der Pol, J. de Sterke, K. P. Wilhelm (2009) Assessment of human stratum corneum thickness and its barrier properties by in vivo confocal Raman spectroscopy. *IFSCC Mag.* 12, 1–8.
- [74] J. W. Fluhr, M. Mao-Qiang, B. E. Brown, P. W. Wertz, D. Crumrine, J. P. Sundberg, K. R. Feingold, P. M. Elias (2003) Glycerol regulates stratum corneum hydration in sebaceous gland deficient (asebia) mice, *J. Invest. Dermatol.* 120, 728–737.

・謝辞

本研究を遂行するにあたり多大なるご指導を頂きました、指導教官である関西学院大学理工学部に加藤知先生、名古屋産業科学研究所の八田一郎先生に心より感謝いたします。また、当論文に関する共同研究を展開して頂きましたカネボウ化粧品の酒井進吾さん、内田崇志さんに心よりお礼申し上げます。また、関西学院大学理工学部の北原和明先生にはデータの解析法について、数多くのご助言を頂きました。ここにお礼申し上げます。本研究を遂行するにあたり、関西学院大学理工学部加藤研究室の皆様には大変お世話になりました。

本研究は、JSPS 科研費 19790805、25870955、JST FS 探索タイプ AS242Z01639P の助成を受けたものです。また三洋化成株式会社からは、グリッドストリッピング法に用いる接着剤の提供を受けました。本研究におけるX線回折実験は、大型放射光施設 SPring-8 のビームライン 03XU (2014A7203、2014B7253) および 40B2 (2009A1163、2010A1482、2010B1240、2011B1145、2012B1489、2013A1276、2013B1468、2014A1447、2014B1510) で実施されました。